

Gaschromatographie - Massenspektrometrie von Oligopeptiden im Urin nach Derivatisierung zu N-Trifluoräthyl-O-trimethylsilyl-aminoalkoholen

Inaugural Dissertation

zur Erlangung
der Philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der Universität Zürich

von
WALTER ERNST STEINER
aus Zürich

Begutachtet von den Herren
PD Dr. A. Niederwieser und Prof. Dr. R. Humbel

1980

Zürich 1979
Zentralstelle der Studentenschaft



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Gaschromatographie - Massenspektrometrie von Oligopeptiden im Urin nach Derivatisierung zu N-Trifluoräthyl-O-trimethylsilyl-aminoalkoholen

Inaugural Dissertation

zur Erlangung
der Philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der Universität Zürich

von
WALTER ERNST STEINER
aus Zürich

Begutachtet von den Herren
PD Dr. A. Niederwieser und Prof. Dr. R. Humbel

Zürich 1979
Zentralstelle der Studentenschaft



I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

ZUSAMMENFASSUNG	5
ABKUERZUNGEN	8
1. EINLEITUNG	9
2. ENTWICKLUNG DER METHODE	12
2.1 Material und Apparate	12
2.2 Derivatisierung von Peptiden	15
2.2.1 Veresterung	18
2.2.2 Acylierung	20
2.2.3 Reduktion	25
2.2.3.1 Lithiumaluminiumhydrid bzw. -deuterid	25
2.2.3.2 Diboran	46
2.3 Diskussion	47
3. ANWENDUNG AUF URIN	52
3.1 Material und Methoden	52
3.1.1 Urinproben	52
3.1.2 Reinigung und Derivatisierung von Urinpeptiden	52
3.2 Resultate	55
3.2.1 Reduktion ohne Vorreinigung der Probe	55
3.2.2 Deuterium/Wasserstoffmarkierung und Verwendung von chemischer Ionisation	56
3.2.3 Identifizierte Urinpeptide	58

3.3	Diskussion	80
3.3.1	Reduktionsmethode	80
3.3.2	Urinoligopeptide	83
3.3.3	Urinhydroxyprolin und Kollagen- abbau	87
3.3.4	Bedeutung der Hyp-Oligopeptide	88
3.3.5	Quantitative Bestimmung von Kollagenpeptiden	90
	LITERATUR	92
	DANK	96
	LEBENS LAUF	97

ZUSAMMENFASSUNG

Die Analyse von Oligopeptiden im Urin ist bei verschiedenen Krankheiten von diagnostischer Bedeutung, z.B. bei Kollagenkrankheiten, verschiedenen Formen von Peptidasemangel und bei Störungen des Peptidtransports oder von Proteinvernetzungsreaktionen. Trotzdem ist die Literatur über die Analyse von Urinpeptiden relativ spärlich, vor allem wohl deshalb, weil keine einfachen Methoden zur Verfügung standen. Besonders die Abtrennung der Oligopeptide von anderen Urinkomponenten erfordern eine ganze Reihe von chromatographischen und elektrophoretischen Verfahren, welche einer breiteren Anwendung im Wege standen.

Die Analyse konnte nun vereinfacht werden, indem ein neues Prinzip zur Trennung der Oligopeptide von den übrigen Urinkomponenten eingeführt wurde: die in einer vorgereinigten Urinprobe enthaltenen Peptide wurden reduziert und die entstandenen Aminoalkoholderivate selektiv isoliert. Die gute Flüchtigkeit und das günstige massenspektrometrische Verhalten der Peptidderivate ermöglichten die qualitative Analyse in einem Gemisch mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS).

Je nach Konzentration der Peptide wurden Urinproben von 5-100 ml Urin auf einem stark sauren Ionenaustauscher gereinigt, mit Thionylchlorid/Methanol verestert, mit Trifluoressigsäureanhydrid acyliert und nach Biemann und Nau zu N-Trifluoräthyl-oligoaminoalkoholen reduziert. Diese wurden durch Adsorption an einen schwach sauren Ionenaustauscher isoliert, O-trimethylsilyliert, auf einer SE 30 Glaskapillar-

säule gaschromatographiert und mittels einer Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Computer-Kombination analysiert. Um die Spezifität zu erhöhen und die massenspektrometrische Interpretation zu erleichtern, wurden aliquote Teile der Probe einerseits mit Lithiumaluminiumhydrid und andererseits mit Lithiumaluminiumdeuterid reduziert. Jedes Peptid gab ein Paar von Derivaten mit charakteristischen Massendifferenzen der entsprechenden Ionen im Massenspektrum, nämlich 2 Masseneinheiten pro reduzierter Oxogruppe (Deuterium/Wasserstoffmarkierung von Oxogruppen durch Reduktion). Die Molekulationen (MH^+) wurden mit chemischer Ionisation ermittelt. Die Zeitdauer für eine Analyse beträgt 3 Tage.

Die Urine von 7 Patienten und 2 Kontrollpersonen wurden untersucht und folgende Peptide gefunden: Gly-Pro-4Hyp-Gly, Gly-Pro-Hyp, Gly-Hyp-Hyp (postuliertes Isomeres Gly-3Hyp-4Hyp), Gly-4Hyp-Gly, Glu-4Hyp, Phe-4Hyp, Pro-4Hyp und Gly-Pro. Mit Ausnahme von Gly-Pro-4Hyp-Gly und Glu-4Hyp konnten alle diese Peptide im Urin eines gesunden Knaben gefunden werden. Andererseits gab das Verfahren für Diglycin, Triglycin und Gly-Pro schlechte Ausbeuten und Tetra- und Pentaglycin konnten nicht nachgewiesen werden. Ueberdies zyklisierten Gly-Pro, Pro-Hyp und Pro-Pro z.T. während der Derivatisierung.

Die Veresterung und Acylierung in einem Schritt mit Pentafluorpropionsäureanhydrid/Hexafluorisopropanol (PFPA/HFIP) bzw. Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA)/HFIP ergab bei Diglycin, Triglycin und Gly-Hyp mehrere Nebenprodukte, bei einem Peptidgemisch konnten aber nach Reduktion keine qualitativen

Unterschiede gegenüber dem Verfahren mit Thionylchlorid/Methanol/TFAA nachgewiesen werden. Bei Triglycin erwies sich das PFPAA/HFIP-Verfahren als überlegen.

Es wurde 2,3,4,5-Tetradeutero-DL-prolin synthetisiert, als Ausgangsmaterial zur Herstellung deuterierter Peptide für die massenfragmentographische Bestimmung von Gly-Pro, Pro-Hyp und Gly-Pro-Hyp.

Abgesehen von der Schwierigkeit, dass sich gewisse Peptide in sehr schlechter Ausbeute derivatisieren lassen, eignet sich die beschriebene Methode gut zur Analyse von Kollagenpeptiden und Hyperoligopeptidurie. Zur Bestimmung von Peptidhormonen im Urin ist sie zu wenig empfindlich.

ABKUERZUNGEN

$A_1, A_2, A_3 \dots\dots$	N-terminale Ionen (siehe Seite 35)
Aminosäuren	Dreibuchstabensymbole nach IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1)
CI	Chemische Ionisation
COM	Computer
EI	Electron impact
FID	Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HEP	Hochspannungselektrophorese
HFIP	Hexafluorisopropanol
m.u.	Masseneinheiten (mass units)
PFP-	Pentafluorpropionyl-
PFPAA	Pentafluorpropionsäureanhydrid
RI	Retentionsindex nach B. Kolb (2)
R_t	Retentionszeit
TFA-	Trifluoracetyl-
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TIC	Totalionenstrom
TMS-	Trimethylsilyl-
TMSDEA	Trimethylsilyldiäthylamin
$Z_1, Z_2, Z_3 \dots\dots$	C-terminale Ionen (siehe Seite 35)

1. EINLEITUNG

Die qualitative Analyse von Urinoligopeptiden ist bei Peptidasemangel, Transport- und Proteinvernetzungsdefekten von diagnostischer Bedeutung. Trotzdem ist in der Literatur nur sehr wenig über Urinpeptide bekannt, weil die Isolierung und Identifizierung einen unverhältnismässigen Arbeitsaufwand bedingt. Mit 20 Aminosäuren sind z.B. für Tetrapeptide 20^4 verschiedene Sequenzen möglich; die für Aminosäuren übliche chromatographische Identifizierung ist daher für Oligopeptide ungenügend und eine Sequenzanalyse ist erforderlich. Die Aufgabenstellung dieser Arbeit war, ein auf Urin anwendbares Verfahren zur direkten Identifizierung von Oligopeptiden in Mischungen zu entwickeln.

Im Urin sind vor allem anorganische Salze, Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure und Aminosäuren neben vergleichsweise geringen Mengen an Oligopeptiden vorhanden. Diese im Ueberschuss vorliegenden Komponenten wurden durch verschiedene Verfahren von den Oligopeptiden abgetrennt, wobei die Hauptschwierigkeit im Entfernen der Aminosäuren bestand.

Da Peptide amphotere Elektrolyte sind, wurde ihre Isolierung über Kombinationen von sauren und basischen Ionenaustauschern (3) erreicht. Eine Trennung nach unterschiedlichem Molekulargewicht wurde mit Gelfiltration (4) durchgeführt. Die Molekulargewichtsunterschiede von Oligopeptiden und Aminosäuren sind aber zu klein, um gute Trennungen zu erhalten. Weitere Trennverfahren beruhen auf der Kupferkomplexbildung von Aminosäuren und Peptiden. Die Peptidbindung beteiligt sich an der Komplexbildung und ermöglicht daher eine spezifische

Isolierung von Oligopeptiden. Wurde das Kupfer an eine Matrix fixiert, so gelang die Trennung von Aminosäuren und Peptiden durch Ligandaustauschchromatographie (5). Wurden die freien Komplexe von Aminosäuren und Peptiden gebildet, so konnte mit Ionenaustauschchromatographie aufgrund unterschiedlicher Ladungen der Komplexe eine Trennung in Aminosäuren, Dipeptide, Tri- und Oligopeptide erreicht werden (6). Auf Seite 80 werden diese Methoden näher besprochen.

Die durch eines der genannten Verfahren erhaltenen Peptidfraktionen können aber immer noch Aminosäuren, Aminosäurenkonjugate und andere Urinkomponenten enthalten, die bei der Identifizierung stören können. Vor der Strukturbestimmung mussten daher die Komponenten einzeln isoliert und chromatographisch weitgehend gereinigt werden.

Weil sich die bisherigen Trennverfahren als unbefriedigend erwiesen, lag es nahe, eine andere Methode zu entwickeln. Der Grundgedanke war, eine chemische Transformation von Oligopeptiden in eine selektiv isolierbare Substanzklasse zu versuchen und die entstandene Mischung direkt mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie zu identifizieren. Dazu schien das von Biemann und Nau (7,8,9) ausgearbeitete Reduktionsverfahren für Oligopeptide, die durch Hydrolyse aus reinen Proteinen gewonnen wurden, am besten geeignet zu sein. Bei diesem Verfahren wird die Polarität der Peptide stark verringert und es entstehen Derivate, die sich aufgrund ihrer Flüchtigkeit und sequenzspezifischen Fragmentierung besonders gut für die GC-MS eignen. Die Massenspektrometrie ist gegenwärtig das einzige Analysenverfahren, das strukturspezifische Identifizierung organischer Komponenten

in Mischungen erlaubt. Durch die Reduktion der Peptidbindungen wird aber auch die Basizität der Verbindung stark erhöht, eine Eigenschaft, die von Biemann und Nau nicht ausgenutzt wurde und von der wir uns, nach Entwicklung eines geeigneten Verfahrens, eine selektive Isolierung dieser Peptidderivate aus dem biologischen Material versprochen. Im folgenden Kapitel wird die Entwicklung der Methode zur Isolierung von Peptiden aus Urin beschrieben, im Kapitel 3 folgt die Anwendung auf Urin.

2. ENTWICKLUNG DER METHODE

2.1 Material und Apparate

Acetonitril (Merck, Darmstadt, F.R.G.), Bortrifluoriddiäthylätherat (Fluka, Buchs, St. Gallen), Butanol, Chloroform, Diäthylamin (Merck), Dichlormethan, Diglym (Diaethylenglykol), Dimethoxyäthan (Fluka), Essigsäureäthylester, Methanol (Merck), Pyridin, Tetrahydrofuran (Fluka) wurden destilliert; Dimethoxyäthan wurde vor der Destillation ca. 4 h über LiAlH_4 am Rückfluss gekocht. Auch Ameisensäure, Essigsäure und Salzsäure (Merck) wurden destilliert. Reagenzien für die Veresterung, Acylierung, Reduktion und Trimethylsilylierung waren 1,1,1,3,3,3 Hexafluor-2-propanol (HFIP, Eastman, Rochester, N.Y., USA), Lithiumaluminiumdeuterid (Merck), Lithiumaluminiumhydrid, Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFPPAA), Thionylchlorid, Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA, Fluka) und Trimethylsilyldiäthylamin (TMSDEA, Pierce, Rockford, IL, USA).

Folgende Aminosäuren und Peptide wurden verwendet: Arg, Gly, His, Lys, Phe, Trp, Tyr (Fluka), DNP-Gly (Serva, Heidelberg, F.R.G.), Ala-His (Fluka), Ala-Phe (Nutrit. Biochem. Corp., Cleveland, Ohio, USA), Arg-Asp (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), Diglycin (Fluka), Gly-Hyp (Serva), Gly-4Hyp-4Hyp (Geschenk von Dr. E. Adams, Baltimore), Gly-Pro (Serva), Gly-Pro-Ala (Fox Chemical Co., Los Angeles, California, USA), Hyp-Gly (EGA-Chemie, Steinheim, F.R.G.), Leu-Gly-Phe (Sigma), Leu-Tyr (Fluka), Lys-Asp (Sigma), Pentaglycin (Fluka), Pro-Hyp, Pro-Pro, Ser-Ser-Ser (Serva), Tetraglycin, Triglycin (Fluka), Trp-Trp (Serva) und Val-Trp (Sigma).

Zur Synthese von deuteriertem Prolin wurden Chlorameisensäureäthylester, Deuterium (Fluka), Deuteriumoxid (Merck), Deuteroäthanol (-OD, Fluka), Magnesiumspäne (Bender & Hobein AG, München, F.R.G.), Methyljodid und Platin(IV)oxid (Fluka) benützt.

Für Färbungen wurden folgende Substanzen gebraucht: Acridin, sym.-Collidin, Ninhydrin (Fluka), Kaliumjodid, Kupfersulfat (wasserfrei), Morin, 10-14% Natriumhypochloritlösung, o-Tolidin (Merck). Weitere verwendete Verbindungen waren Aluminiumchlorid (Fluka), Aluminiumoxalat (Merck) und Polyäthylenimin M 60'000 (Serva). Die Ionenaustauscher Amberlite CG 50 II, 40-80 μ m (Serva), Dowex 50W X8, 200-400 mesh (Fluka), Cellulose-P Whatman P11 (Whatman, Biochemicals Ltd., Maidstone, Kent, England) wurden vor ihrer ersten Verwendung dreimal nacheinander mit 1 M NaOH, 1 M HCl und destilliertem Wasser gespült. Die Ionenaustauscher wurden nach jedem Gebrauch wieder regeneriert: Amberlite CG 50 II wurde mit 2 M Ameisensäure gewaschen und auch in dieser Lösung aufbewahrt; vor jeder neuen Verwendung wurde die Säule mit 1 M Pyridiniumacetat pH 5 äquilibriert und mit 0.01 M Pyridiniumacetat pH 5 gespült. Dowex 50W X8 und Cellulose-P Whatman P11 wurden mit 1 M NaOH, 1 M HCl und destilliertem Wasser, Porapak Q, 150-200 mesh (Waters Assoc. Inc., Framingham, Mass., USA) fünfmal mit Aceton und zehnmal mit destilliertem Wasser durchgespült.

Die Hochspannungselektrophorese (HEP) wurde mit einem Camag-Elektrophoresegerät (Firma Camag, Muttenz) durchgeführt auf 20x40 cm Elektrophoresepapier Nr. 2043 (Schleicher & Schuell AG, Feldbach). Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kiesel-

gelplatten 60F-254 (Merck AG, Darmstadt) verwendet.

Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Die Peptidderivate wurden auf einer 1 m x 2 mm Säule (2% SE 30 auf Chromosorb G, AW-DMCS oder 2% Dexsil auf Chromosorb W, AW, Supelco, Inc., Bellefonte, Pennsylvania, USA) oder auf einer 25 m x 0.3 mm SE 30 Glaskapillare (LKB, Bromma, Schweden) in einem Carlo Erba Modell 2101 AC Gaschromatographen aufgetrennt. Dieser war über eine Platinkapillare bzw. später über eine GLT-Kapillare (ESGE) direkt an ein Micromass F-16 Massenspektrometer (Vacuum Generators Micromass, Winsford, England) gekoppelt, der mit einem DS 2020 Datensystem (Vacuum Generators) kombiniert war. Die Temperaturen waren: Injektor 300° C; Gaschromatographiekolonnen 100-280° C mit Aufheizraten zwischen 4 und 10° C/min; Transferline 300° C; Ionenquelle 215° C. Der Heliumfluss war für die Kapillare 2 ml/min, für die gepackten Säulen 35 ml/min. Die Splitverhältnisse für die Kapillare wurden zwischen 1:4 und 1:15 variiert. Spektren wurden für electron impact (EI) bei 50 µA und 20 eV aufgenommen, bei Scanzeiten für die Kapillare von 1 sec, für die gepackten Säulen von 3 sec; für chemische Ionisation (CI) waren die entsprechenden Daten 200 µA, 50 eV und 1 sec. CI Spektren wurden mit Hilfe einer Parallelschaltung von Flammenionisationsdetektor (FID) und Totalionenstrom (TIC) aufgezeichnet (10).

2.2 Derivatisierung von Peptiden

Zur Gaschromatographie-Massenspektrometrie müssen Peptide infolge ihres polaren Charakters in Derivate verwandelt werden, die folgende Kriterien erfüllen sollen: möglichst niedriger Siedepunkt (Leichtflüchtigkeit), möglichst niedriges Molekulargewicht und Zerfall in möglichst wenige sequenzspezifische Ionen.

Die in der Literatur beschriebenen Peptidderivate für die Massenspektrometrie unterscheiden sich hauptsächlich durch die Aminoschutzgruppe und durch reduzierte oder methylierte Peptidbindungen. Für den Schutz der Carboxylgruppe hat sich der Methylester eingebürgert, aber auch der Trimethylsilyl-ester erwies sich als praktisch (11).

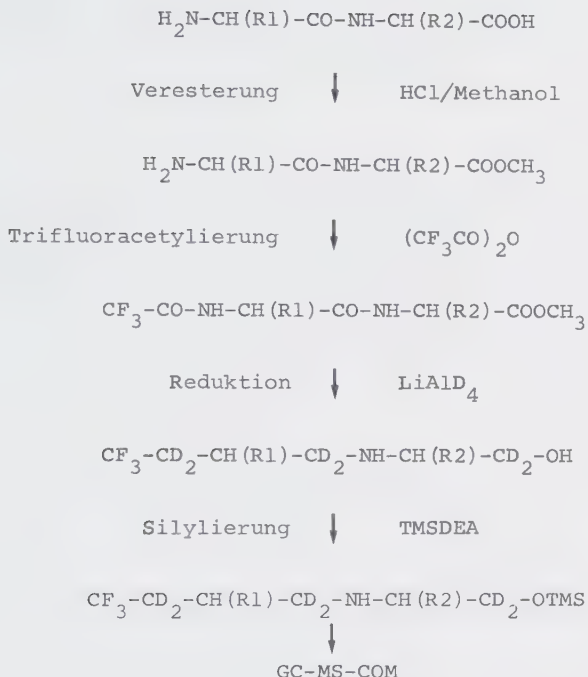
Die Pentafluorpropionyl-derivate (12,13,14) sind gut flüchtige Verbindungen, haben aber ein hohes Molekulargewicht. Umgekehrt verhalten sich Acetyl-derivate (14,15,16), die einen hohen Siedepunkt und ein niedriges Molekulargewicht aufweisen. Einen niedrigeren Siedepunkt als Acetyl-derivate, bei einer Differenz von 55 Masseneinheiten (m.u.) pro Aminoschutzgruppe, zeigen die Trifluoracetyl-derivate, die häufig verwendet werden (17,18,19,20,21). Als weitere Aminoschutzgruppen für die Massenspektrometrie von Peptiden sind die Succinyl- (22), die Neopentyliden- und Aethoxycarbonylpropenyl- (18) und die 7-Isopropyl-1-methylazulen-4-ylacetyl- und 1-Naphtylacetyl- (23) Gruppen verwendet worden. Die 3 letztgenannten Derivate wurden zur Analyse von Dipeptidgemischen mit MS ohne gaschromatographische Trennung eingesetzt.

Eine höhere Flüchtigkeit kann erreicht werden, wenn neben der Verwendung von Amino- und Carboxylschutzgruppen noch die

Polarität der Peptidbindung verringert wird. Permethylierte Acetyl-peptid-methylester finden häufig Verwendung (24,25, 26,27,28), selbstverständlich auch die permethylierten TFA-Derivate (29,30). Werden sämtliche Carbonyl- und Carboxylgruppen eines Peptids reduziert, so entstehen sehr flüchtige Derivate (31). Die flüchtigsten Peptidderivate sind die O-TMS Derivate von reduzierten Heptafluorbutyryl-peptid-methylestern (7). Ihre Molekulargewichte kommen aber schon bei Dipeptiden rasch in Bereiche über 600. Wie bei den nicht reduzierten Peptidderivaten ist die Wahl einer TFA-Gruppe für reduzierte Peptidderivate eine Kompromisslösung zwischen Derivaten mit höherer Flüchtigkeit (reduzierte Heptafluorbutyrylderivate) und niedrigerem Molekulargewicht (reduzierte Acetylderivate).

Neben der besseren Flüchtigkeit von Trifluoracetyl- gegenüber Acetylderivaten sind aber auch deren Massenspektren als O-TMS Polyaminoalkoholderivate sicherer interpretierbar, weil die Ionen, die Hinweise auf die Sequenz eines Peptids geben, in ausgeglichenerer Intensität auftreten (7). Die reduzierten O-TMS Derivate zeigen, neben den permethylierten Peptidderivaten, das beste massenspektrometrische Verhalten unter den Peptidderivaten und sie sind leichter flüchtig als die permethylierten Verbindungen (31). Sie eignen sich daher besonders gut zur Identifizierung von Peptidgemischen mit GC-MS.

Im folgenden Schema wird am Beispiel eines Dipeptids das von Biemann und Nau (7,8) beschriebene Derivatisierungsverfahren von Peptiden zu deuterierten N-Trifluoräthyl-O-trimethylsilyl-polyaminoalkoholen dargestellt:



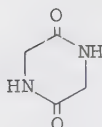
Biemann und Nau gingen von reinen Proteinen aus, spalteten diese zu Oligopeptiden und rekonstruierten mit den gefundenen Teilsequenzen die Sequenz des ursprünglichen Proteins (8,9).

Zur Nacharbeitung der Reduktionsmethode wurden als Modellsubstanzen die strukturell einfachen Peptide Diglycin, Triglycin etc. $(\text{Gly}(-\text{Gly})_n)$ sowie die im Urin vorkommenden Peptide Glycylprolin, Prolylhydroxyprolin, Prolylprolin und Glycylprolylalanin gewählt. Weil sich nach dem beschriebenen Verfahren ein Teil dieser Peptide schwer nachweisen liess oder

weil sich Nebenprodukte bildeten, wurden an einigen Verbindungen die Veresterung, die Acylierung und die Reduktion untersucht und auch verschiedene Modifikationen vorgenommen.

2.2.1 Veresterung

Das von Biemann und Nau verwendete Veresterungsverfahren mit Salzsäure/Methanol bewirkte bei Gly-Phe-Ser die Bildung von cyclo-Phe-Ser (32) und die Spaltung von Peptidbindungen (12, 32), im speziellen auch die Spaltung von Triglycin (33). Durch Zyklisierung entsteht z.B. aus Diglycin folgendes Produkt:



cyclo-Gly-Gly (Diketopiperazin)

Zur Veresterung wurde daher anstelle von Salzsäure/Methanol Thionylchlorid/Methanol verwendet und dieser Reaktionsschritt an Diglycin, Triglycin, Tetraglycin, Pentaglycin, Glycylprolin und Prolylhydroxyprolin untersucht.

Ca. 0.5-1 mg Peptid wurde in einer Lösung von 1.8 ml Methanol und 0.2 ml Thionylchlorid zwischen -20 und -10° C 30 min verestert. Nach Zugabe von 0.6 ml Benzol wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft und vom Rückstand eine 0.1%ige wässrige Lösung hergestellt.

Auf ein Elektrophoresepapier wurde der Länge nach eine Mittellinie gezogen. Auf einer senkrechten Linie dazu, in 15 cm Abstand vom Blattende (Anodenseite), wurden 10-50 µl einer wässrigen 0.1%igen Lösung der Referenzpeptide und der veresterten Probe je links und rechts der Mittellinie aufgetragen. Bedingungen für die HEP waren: Puffer (240 ml Essigsäure, 52 ml Ameisensäure ad 2 l mit destilliertem Wasser) pH 1.9, 17 min, 4'000 V. Das Blatt wurde 10 min auf 100° C erhitzt, der Mittellinie entlang entzweigeschnitten, die eine Hälfte mit Ninhydrin (Moffat Lytle Reagens), die andere mit Chlor/Tolidin angefärbt (siehe unten). Die Ninhydrinfärbung diente dazu, den Umsatz vom Peptid zum Methylester und eventuell entstandene Spaltprodukte, die Chlor/Tolidinfärbung, Diketopiperazine nachzuweisen. Bei der Entstehung eines Diketopiperazins hätte ein gefärbter Startfleck erscheinen müssen, weil aus den untersuchten Peptiden keine geladenen Diketopiperazine entstehen können.

Ninhydrinfärbung: Zu 90 ml Aceton wurden 0.5 g Ninhydrin, 5 ml sym.-Collidin und 5 ml Kupfersulfatlösung (2 ml gesättigte Kupfersulfatlösung ad 10 ml mit Wasser und anschliessend mit Methanol ad 200 ml) gegeben. Das getrocknete Chromatogramm wurde durch diese Lösung gezogen und 10 min auf 100° C erhitzt.

Chlor/Tolidinfärbung: Das trockene Chromatogramm wurde mit den Lösungen A (13 ml 10-14% Natriumhypochloritlösung ad 100 ml aufgefüllt), B (10% Essigsäure) und C (160 mg o-Tolidin in 30 ml Essigsäure gelöst, mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt und 1 g Kaliumjodid zugegeben) besprüht, mit jeweiligen Wartezeiten von 5-10 min nach dem Besprühen.

Die Veresterung verlief bei Diglycin, Triglycin, Tetraglycin und Pentaglycin ohne die Bildung von cyclo-Gly-Gly (Diketopiperazin) oder anderen Nebenprodukten.

Auch bei Pro-Hyp konnte keine Methanolyse oder Zyklisierung nachgewiesen werden, hingegen bildete sich bei Gly-Pro ein

Nebenprodukt (kein cyclo-Gly-Pro) das aber nicht identifiziert werden konnte. Wurde mit Diazomethan verestert, so entstand das gleiche Nebenprodukt wie mit Thionylchlorid/Methanol.

2.2.2 Acylierung

Die Trifluoracetylierung mit TFAA wurde an Gly-Gly, Gly-Pro und Pro-Hyp näher untersucht.

Ca. 0.5-1 mg Peptid wurde in einer Lösung von 1.8 ml Methanol und 0.2 ml Thionylchlorid zwischen -20 und -10° C 30 min verestert. Nach Zugabe von 0.6 ml Benzol wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft, noch zweimal mit 1 ml Benzol/Methanol 1:3 v/v versetzt und eingedampft. Mit 0.5 ml Trifluoressigsäureanhydrid wurde 45 min bei Raumtemperatur acyliert. Die Probe wurde mit Stickstoff trocken geblasen und in 2 ml Essigester aufgenommen. Ca. 1 µl dieser Lösung wurde für GC-MS verwendet (1 m 2% SE 30 Säule, MS-Bedingungen siehe Abschn. 2.1).

Die Trifluoracetylierung verlief bei Diglycin eindeutig ($R_t = 10.3$ min, 3 min isotherm bei 70° C, 70-240° C, 10° C/min, Massenspektrum, m/e (% relative Intensität): M^+ : 282(1); 6 intensivste Ionen ab Masse 50: 127(100), 88(92), 116(91), 126(39), 183(12), 59(8).

Bei Gly-Pro konnten nach der Trifluoracetylierung 4 Produkte nachgewiesen werden (A, B, C, D). Die Analyse dieser Produkte ergab folgende Resultate:

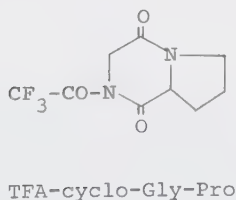
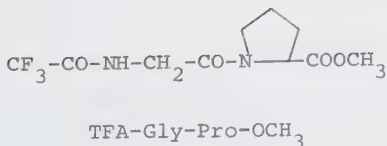
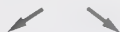
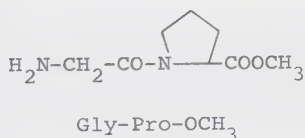
A: nicht identifiziert, 4%, $R_t = 11$ min, Massenspektrum, m/e (% rel. Int.), Ionen ab Masse 50: 54(1), 55(6), 56(9), 68(9), 69(9), 70(100), 71(11), 73(3), 77(7), 78(9), 79(1), 80(1), 81(1), 82(2), 83(3), 95(3), 97(4), 98(5), 99(2),

102(5), 104(1), 121(2), 126(15), 130(3), 156(2), 157(1),
158(2), 194(1), 223(5)

B: TFA-cyclo-Gly-Pro (Formel siehe unten), 26%, $R_t = 13.2$
min, 5 min isotherm bei 120° C, 100-250° C, 10° C/min
Massenspektrum: M^+ : 250 (<1), 6 intensivste Ionen ab Masse
50: 70(100), 56(39), 111(37), 83(32), 69(21), 55(21)

C: TFA-Gly-Pro-OCH₃, 60%, $R_t = 14.6$ min, Massenspektrum: M^+ :
282(1), 6 intensivste Ionen ab Masse 50: 70(100), 128(8),
69(8), 126(6), 71(5), 56(5)

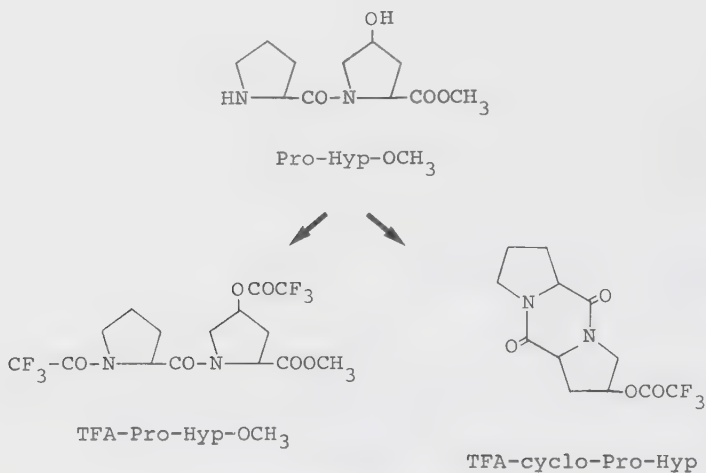
D: nicht identifiziert, ca. 10%, $R_t = 15.2$ min, schlecht
von C abgetrennt, das Massenspektrum war daher überlagert
von Ionen der Verbindung C.



Bei Pro-Hyp entstand neben TFA-Pro-Hyp-OCH₃ ($R_t = 18.9$ min,
5 min isotherm bei 100° C, 100-280° C, 10° C/min) noch das
Diketopiperazin ($R_t = 18.7$ min) Massenspektren, m/e (% rel.
Int.), 6 intensivste Ionen ab Masse 40:

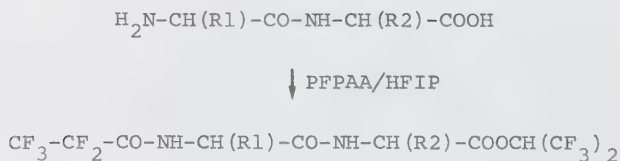
TFA-Pro-Hyp-OCH₃: 166(100), 434 (M⁺, 72), 194(44), 40(43),
240(39), 167(34)

TFA-cyclo-Pro-Hyp: 70(100), 193(56), 306 (M⁺, 52), 69(50),
124(29), 181(28)

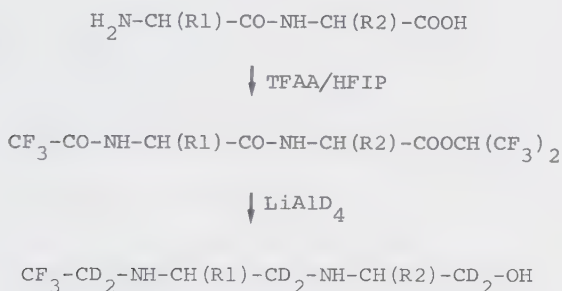


Neben dem Verfahren mit Thionylchlorid/Methanol/TFAA wurde noch die Veresterung und Acylierung mit PFPAA/HFIP bzw. TFAA/HFIP untersucht.

Bertilsson und Costa (34) beschrieben eine Einschrittreaktion zur Acylierung und Veresterung von γ -Aminobuttersäure und Glutaminsäure mit PFPAA und HFIP. Peptide sollten demnach wie folgt reagieren:



Folgt auf diese Derivatisierung eine Reduktion, so spielt die Art des Esters keine Rolle, weil dieser zum Alkohol reduziert wird. Ersetzt man PFPAa durch TFAA, so sollten nach der Reduktion dieselben Produkte entstehen wie beim Verfahren nach Biemann und Nau:



Damit wäre eine gute Möglichkeit gegeben, beide Verfahren direkt miteinander zu vergleichen, ohne zusätzliche massenspektrometrische Daten neuer Derivate sammeln zu müssen.

Die Derivatisierung mit PFPAa/HFIP bzw. TFAA/HFIP wurde an Diglycin, Triglycin und Glycylhydroxyprolin näher untersucht.

In ein Hydrolyserohr (10 x 1 cm), das 0.5-1 mg Peptid enthielt, wurde eine Lösung von 0.3 ml PFPAa und 0.15 ml HFIP oder 0.3 ml TFAA und 0.15 ml HFIP pipettiert. Das Hydrolyserohr wurde zugeschmolzen und 1 h auf 60° C erhitzt. Nach Abkühlen und Öffnen des Hydrolyserohrs wurde der Inhalt mit Stickstoff trocken geblasen, in 2 ml Essigsäureäthylester aufgenommen und ca. 1 µl dieser Lösung zur Analyse mit GC-MS verwendet (1 m 2% SE 30 Säule, MS-Bedingungen siehe Abschn. 2.1).

Mit Diglycin entstanden im wesentlichen 3 Produkte ($R_t = 4.9$ min, 6.8 min und 11.9 min, 6 min isotherm bei 80° C, 80-280° C, 5° C/min) wobei der vom PFP-Gly-Gly-OCH(CF₃)₂ stammende Peak ($R_t = 6.8$ min) am kleinsten war. Das Massenspektrum wies noch auf eine teilweise acylierte Peptidbindung hin (gleichzeitiges Auftreten der Ionen 225 und 370, mögliche Strukturen: $H_2\overset{+}{N}-CH_2-COOCH(CF_3)_2$ und $CF_3-CF_2-CO-\overset{+}{NH}=CH-COOCH(CF_3)_2$). Der TIC zeigte auch keinen gleichförmigen Anstieg, sondern mehrere Absätze bis zum Peakmaximum, was auf die Anwesenheit anderer Verbindungen hinwies. Derselbe Verlauf war auch bei den andern zwei Peaks zu beobachten, die aber nicht identifiziert werden konnten.

Beim Triglycinderivat war nur ein Peak ($R_t = 13.2$ min, 3 min isotherm bei 100° C, 10° C/min) zu sehen, der aber ebenfalls Schultern aufwies. Das Massenspektrum wies auf den PFP-triglycin-hexafluorisopropylester hin mit teilweiser Acylierung der C-terminalen Peptidbindung (gleichzeitiges Auftreten der Ionen 225 und 370).

Der Versuch, durch Herabsetzung der Reaktionstemperatur auf 20° C eine Acylierung der Peptidbindung zu vermeiden, brachte weder beim Diglycin noch beim Triglycin den gewünschten Erfolg.

Die Derivatisierung von Diglycin und Triglycin mit TFAA/HFIP zeigte einen zur Derivatisierung mit PFPP/HFIP analogen Verlauf. So ergab die Reaktion mit Diglycin 3 Produkte mit $R_t = 8.1$ min, 10.6 min (TFA-Gly-Gly-OCH(CF₃)₂), 17.1 min (6 min isotherm bei 80° C, 80-280° C, 5° C/min) und die Reaktion mit Triglycin mehrere, gaschromatographisch nicht trennbare Produkte mit $R_t = 13.4$ min (6 min isotherm bei

100° C, 100-280° C, 10° C/min). Die Massenspektren beider Verbindungen wiesen auf eine acylierte Peptidbindung hin (gleichzeitiges Auftreten der Ionen 225 und 320, mögliche Strukturen: $\text{H}_2\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COOCH}(\text{CF}_3)_2$ und $\text{CF}_3-\text{CO}-\text{NH}^+=\text{CH}-\text{COOCH}(\text{CF}_3)_2$).

Auch bei Glycylhydroxyprolin zeigte sich nach Derivatisierung mit PFPAA/HFIP bzw. TFAA/HFIP ein gaschromatographischer Peak mit Schultern, sowohl für PFP-Gly-Hyp-OCH(CF₃)₂ (R_t = 6 min, 6 min isotherm bei 140° C, 140-280° C, 10° C/min) als auch für TFA-Gly-Hyp-OCH(CF₃)₂ (R_t = 11 min, 3 min isotherm bei 100° C, 100-280° C, 10° C/min).

2.2.3 Reduktion

2.2.3.1 Lithiumaluminiumhydrid bzw. -deuterid

Um beurteilen zu können, ob die Derivatisierung von Peptiden und die Isolierung der Aminoalkoholderivate nach dem von Nau (7) angegebenen Verfahren auf Urin anwendbar ist, wurde ein Peptidgemisch streng nach Vorschrift umgesetzt.

Ca. 0.6-1.3 mg Peptid wurde mit 5 ml ca. 1 M Salzsäure/Methanol über Nacht bei 45° C verestert. Mit Stickstoff wurde die Probe zur Trockne geblasen und die restliche Salzsäure noch während einer Stunde mit einer Hochvakuumpumpe entfernt. Die Trifluoracetylierung wurde mit 0.2 ml Tri-*fluore*ssigsäureanhydrid bei Raumtemperatur während 45 min durchgeführt. Die Probe wurde nach Ueberführen in ein Hydrolyserohr (10 x 1 cm) mit Stickstoff trocken geblasen und der Rückstand bei 0° C mit 3 ml des klaren Ueberstandes einer 0.25 M LiAlD₄ in Dimethoxyäthan versetzt. Nach Zugabe eines in Glas eingeschmolzenen Magnetrührers wurde das Hydrolyserohr zugeschmolzen und der Inhalt 5 Stunden bei 0° C und nach langsamem Aufwärmen auf 90° C 24 h bei dieser Temperatur gerührt. Das Gemisch

wurde bei 0° C unter Rühren mit 2 ml Methanol tropfenweise versetzt und die Aluminiumsalze mit 10 Tropfen Wasser unter starkem Rühren ausgefällt.

Das Präzipitat wurde filtriert und der Rückstand in 10 ml heissem Methanol 15 min beschallt. Die Suspension wurde filtriert und der Filterrückstand erneut in 100 ml heissem Methanol beschallt. Nach Filtration der Suspension wurden die beiden Methanol-Extrakte vereinigt, zur Trockne eingedampft und der Rückstand zweimal 20 min in 10 ml Chloroform beschallt. Die vereinigten, filtrierten Chloroform-Extrakte wurden eingedampft und der Rückstand mit 0,4 ml Pyridin und 0,2 ml TMSDEA bei 55° C 1 h silyliert. Die Lösung wurde auf ca. 0,1 ml eingengt (Stickstoffstrom) und 1 μ l dieser Lösung zur Analyse mit GC-MS verwendet (1 m 2% SE 30 Säule, $80-330^{\circ}$ C, 6° C/min), MS-Bedingungen siehe Abschn. 2.1).

Tabelle 1 stellt das Resultat dieses Versuchs dar.

Tab. 1: Reduktion eines Peptidgemischs

Eingesetzte Peptide 0.6-1.3 mg	Als Aminoalkoholderivat nachgewiesen
Leu-Ala	+
Glu-Gly	+
Leu-Met	+
(Ala) ₄	- *
Met-Asp	+
Phe-Leu	+
Lys-Phe	+
His-Leu	+
His-Phe	+
Trp-Trp	-

* Der Nachweis gelang später am einzeln derivatisierten Peptid

Es zeigte sich, dass die Trennung der Gemische auf einer gepackten gaschromatographischen Säule ungenügend und dadurch die Interpretation der Massenspektren ohne Erfahrung problematisch war. Die Verwendung von Glaskapillarsäulen gab wesentlich bessere gaschromatographische Trennungen und ermöglichte eine sicherere Identifizierung der Aminoalkoholderivate. Diese schien auch deshalb notwendig zu sein, weil Urin neben Aminosäuren, Peptiden und Polyaminen eine Fülle anderer Verbindungen enthält. In den bis jetzt veröffentlichten Arbeiten waren immer nur reine Oligopeptide (7,17,18) oder Oligopeptidgemische untersucht worden, die durch Partialhydrolyse aus reinen Proteinen gewonnen wurden (8,37).

In einer weiteren Hinsicht schien das Verfahren unbefriedigend: Nau (7) extrahierte die Aminoalkoholderivate mit Chloroform und Methanol aus einem gelartigen Präzipitat. Diese Extraktion wäre infolge der vielen im Urin vorhandenen Verbindungen wenig selektiv. Eine ältere von Kelley, Nau und Biemann (8) ausgearbeitete Reinigungsmethode des Reduktionsgemischs über einen Anionenaustauscher war auch nicht geeignet. Dabei wurden die aus LiAlD_4 freigewordenen Aluminiumionen in Form von Aluminiumoxalatokomplexen am Anionenaustauscher Bio Rad Ag 1 - X8 (Bicarbonatform) adsorbiert und die reduzierten Peptidderivate mit den Lithiumionen (aus LiAlH_4) eluiert. Mit Urin als Ausgangsmaterial würden aber noch weitere Kationen in Form von Bicarbonaten vom Anionenaustauscher eluiert. Für eine GC-MS Bestimmung eignet sich eine Probe mit viel Salzen schlecht, so dass ein weiterer Trennschritt erforderlich wäre.

Vom schwach sauren Kationenaustauscher Amberlite CG 50 II, der Polyamine stark adsorbiert, waren folgende Vorteile zu erwarten:

(1) Die reduzierten Peptidderivate sollten stark am Ionen-austauscherharz adsorbiert werden. Andere Kationen würden durch diese starken Basen vom Harz verdrängt, Anionen durch das Donnan-Potential ausgeschlossen, so dass unter geeigneten Bedingungen nur noch Aminoalkoholderivate und andere starke Basen gebunden würden, die anschliessend mit einem konzentrierten Puffer eluiert werden könnten.

(2) Die Kapazität des Kationenaustauschers würde im wesentlichen für die Aminoalkoholderivate gebraucht und nicht, wie beim Anionenaustauscher, für die im Ueberschuss vorhandenen, negativ geladenen Aluminiumoxalatokomplexe und die übrigen Anionen aus Urin. Die Reinigung der Aminoalkoholderivate würde daher mit dem Kationenaustauscher eine kleinere Säule erfordern als mit dem Anionenaustauscher.

Aus diesen Gründen wurde eine Methode entwickelt, welche die Isolierung der Aminoalkoholderivate über den Kationenaustauscher Amberlite CG 50 II ermöglichte.

Zur Aufarbeitung des Reduktionsgemischs, das bei der Reduktion mit LiAlH_4 bzw. LiAlD_4 entsteht, schien ein flüchtiger Puffer am besten geeignet. Als flüchtige Puffer kamen Pyridiniumacetat und Pyridiniumformiat in Frage. Aufgrund des Arbeitsbereichs von Amberlite CG 50 II und des pH-Bereichs dieser Puffer wurde zur Isolierung der Aminoalkoholderivate aus dem Reduktionsgemisch der pH-Wert 5 gewählt. Die Abtrennung der Aluminiumionen in Form von Aluminiumoxalatokomplexen war aber mit Bio Rad Ag 1 - X8 bei pH 7

vollzogen worden (8). Es galt daher als erstes, die Stabilität von Aluminiumoxalatokomplexen bei pH 5 zu untersuchen. Dazu wurde die elektrophoretische Mobilität von Aluminium-III-ionen, Aluminiumoxalat und Oxalat bei pH 5 verglichen. Unterscheiden sich die Mobilitäten dieser drei Ionen und lässt sich der Aluminiumoxalatokomplex unzersetzt als einheitliche Zone einerseits für Aluminiumionen, andererseits für Oxalat anfärben, so kann der Aluminiumoxalatokomplex als stabil betrachtet werden.

Aluminiumchlorid, Aluminiumoxalat und Oxalsäure (alle 0.3 M) wurden in 0.02 M Pyridiniumacetat pH 5 in Mengen von 10 µl auf zwei Elektrophoresepapiere aufgetragen. Bedingungen für die HEP waren: 0.02 M Pyridiniumacetat pH 5, 5 min, 4'000 V. Von den bei 100° C getrockneten Chromatogrammen wurde das eine mit Morin (Nachweis von Aluminiumionen, 38) angefärbt, das andere mit Acridin (Nachweis von Oxalationen, 39). Morin wurde als Sprühreagens (1% Morin in Eisessig) verwendet, bei der Acridinfärbung wurde das Chromatogramm durch eine Lösung von 0.1 g Acridin in 100 ml 96% Aethanol gezogen und an der Luft getrocknet.

Wie erwartet, wanderte das Aluminiumion zur Kathode, der Aluminiumoxalatokomplex und das Oxalat zur Anode, wobei der Komplex eine grössere Mobilität zeigte als Oxalat und unzersetzt als einheitliche Zone mit Morin- und Acridinfärbung erschien. Der Aluminiumoxalatokomplex ist somit bei pH 5 stabil.

Zur Ermittlung eines geeigneten diskontinuierlichen Elutionssystems für die Reinigung und Elution von Aminoalkoholderivaten wurde ein linearer Gradient von 0.01-1 M Pyridiniumacetatpuffer pH 5 verwendet. An Testverbindungen wie z.B. reduziertem Ala-Phe, Leu-Tyr oder Leu-Gly-Phe konnte er-

mittelt werden, dass beim Erreichen einer 1 M Pyridiniumacetatkonzentration die Aminoalkoholderivate bereits eluiert waren. Der Aluminiumoxalatokomplex und die Lithiumsalze hingegen waren bei einer Pufferkonzentration von 0.2 M ausgewaschen (der Nachweis der Lithiumionen erfolgte flammenphotometrisch). Mit Hilfe weiterer Versuche wurde festgestellt, dass der Aluminiumoxalatokomplex und die Lithiumsalze bereits mit 0.01 M Pyridiniumacetat eluierten. Schliesslich wurde das folgende diskontinuierliche Puffersystem gewählt:

1. Fraktion 50 ml Probe (aus Reduktionsgemisch)
2. Fraktion 50 ml 0.01 M Pyridiniumacetat pH 5
3. Fraktion 50 ml 1 M Pyridiniumacetat pH 5
4. Fraktion 50 ml 2 M Ameisensäure

Die zweite Fraktion enthielt die Aluminium- und Lithiumionen vollständig, die dritte die Aminoalkoholderivate. Die vierte Fraktion diente der Reinigung der Säule.

Zu klären blieb noch die Frage, wie weit Polyaminoalkoholderivate adsorbiert würden und nicht mehr eluiert werden könnten. Als Testsubstanz wurde Polyäthylenimin verwendet.

1 mg Polyäthylenimin mit einem Molekulargewicht von 60'000 wurde auf eine Amberlite CG 50 II Säule (1 x 1 cm) aufgetragen und das Harz mit 20 ml 1 M Pyridiniumacetatpuffer, 20 ml 2 M Ameisensäure und 20 ml 2 M Salzsäure gewaschen. Jede Fraktion wurde eingedampft, der Rückstand in 0.5 ml Wasser aufgenommen und 50 µl dieser Lösung zur HEP aufgetragen (pH 1.9, 17 min, 4'000 V, Ninhydrinfärbung, siehe Abschn. 2.2.1). Als Vergleich diente 20 µl einer 0.1%igen Lösung von Polyäthylenimin in Wasser. In der Salzsäurefraktion konnte Polyäthylenimin nachgewiesen werden.

Mit 2 M Salzsäure waren also hochmolekulare Polyaminoalkohol-derivate eluierbar. Der gewählte Ionenaustauscher schien gut geeignet zu sein.

Neben Amberlite CG 50 II wurde noch der Kationenaustauscher Cellulose-P 11 Whatman untersucht. Obwohl sich auch dieser Ionenaustauscher zur Reinigung des Reduktionsgemischs gut bewährte, wurde nicht weiter damit gearbeitet, weil der Durchfluss der Elutionsmittel je nach pH stark unterschiedlich war.

Das Originalverfahren von Nau ergibt bei Ser-Ser eine schlechte Ausbeute (persönliche Mitteilung von H. Nau). Als noch schwierigeres Beispiel wurde Triserin mit dem neu entwickelten Verfahren nachgewiesen (die folgende experimentelle Beschreibung gilt für alle weiteren Versuche mit dem neuen Verfahren).

Ca. 0.5-1 mg Peptid wurde in einer Lösung von 1.8 ml Methanol und 0.2 ml Thionylchlorid zwischen -20 und -10° C 30 min verestert. Nach Zugabe von 0.6 ml Benzol wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft, noch zweimal mit 1 ml Benzol/Methanol 1:3 v/v versetzt und eingedampft. Mit 0.5 ml Trifluoressigsäureanhydrid wurde 45 min bei Raumtemperatur acyliert. Das Gemisch wurde in ein Hydrolyserohr (10 x 1 cm) transferiert und mit Stickstoff trocken geblasen. Bei 0° C wurden 3 ml des klaren Ueberstandes einer 0.25 M Lithiumaluminiumhydrid- bzw. Lithiumaluminiumdeuteridlösung in Dimethoxyäthan und ein in Glas eingeschmolzener Magnetrührer dazugegeben. Unter Kühlung der Lösung mit Methanol-Trockeneis wurde das Rohr zugeschmolzen und der Inhalt 12 h bei 40° C und 24 h zwischen 75 und 90° C gerührt. Das Gemisch wurde dann in ein 50 ml Erlenmeyerkölbchen pipettiert und bei 0° C tropfenweise mit 4.5 M Oxalsäure in destilliertem Wasser versetzt (theoretische Menge an Oxalsäure zur

Komplexierung von Aluminiumionen aus LiAlH_4 bzw. LiAlD_4). Die Lösung wurde mit 0.3 bis 0.4 ml Pyridin auf pH 5 eingestellt und mit destilliertem Wasser ad 50 ml aufgefüllt (Verminderung der Salzkonzentration), auf eine Amberlite CG 50 II Säule (1 x 3.5 cm) aufgetragen, mit 50 ml 1 M Pyridiniumacetat pH 5 Salze und Neutralstoffe entfernt und mit 50 ml 1 M Pyridiniumacetat pH 5 das Aminoalkoholderivat eluiert. Letztere Fraktion wurde zur Trockne eingedampft und Wasserspuren mit je 1 ml Benzol/Methanol 1:3 v/v durch dreimalige azeotrope Destillation entfernt (Benzol bildet ein Azeotrop mit Wasser, Methanol diente als Lösungsvermittler). Der Rückstand wurde mit Benzol/Methanol in ein 10 ml Schliffröhrchen transferiert, zur Trockne eingedampft und mit 0.2 ml Diäthylamin und 0.1 ml TMSDEA für 60 min bei 55° C trimethylsilyliert.

Das Derivat von Triserin entstand in guter Ausbeute und ohne Nebenprodukte ($R_t = 18$ min, 1 m 2% SE 30 Säule, 3 min isotherm bei 150° C, 150-280° C, 5° C/min, Massenspektrum siehe Fig. 1). Typische Fragmentierungen der in diesem Kapitel abgebildeten Aminoalkoholderivate sind in Tab. 3 angegeben und in der Legende erklärt, die Namen der Verbindungen nach IUPAC Nomenklatur (40) sind in Tab. 4 aufgeführt. Die gute Ausbeute deutet darauf hin, dass die Aufarbeitung über Ionenaustauscher bei polaren Polyaminoalkoholderivaten der Extraktion aus einem Gelpräzipitat überlegen ist.

Zum Vergleich des Aufarbeitungsverfahrens durch Extraktion (Nau, 7) und durch Ionenaustausch auf Amberlite CG 50 II (eigene Methode) wurde ein Peptidgemisch (Tab. 2) nach der Reduktion geteilt und nach den beiden Methoden aufgearbeitet.

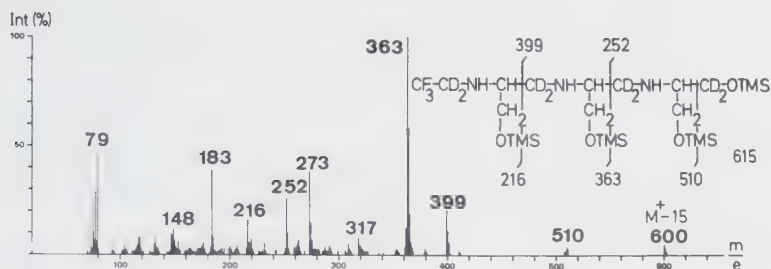


Fig. 1: Electron impact Massenspektrum bei 20 eV von deuteriertem Ser-Ser-Ser (I, als N-Trifluoräthyl-O-trimethylsilyl-aminoalkohol)

Tab. 2: Vergleich von Extraktion und Ionenaustausch

Peptidgemisch (je 1 mg)	Nachweis als Aminoalkoholderivat nach	
	Extraktion (Nau, 7)	Ionenaustausch (eigenes Verfahren)
Ala-Phe	+	+
Lys-Asp	+	+
Ala-His	+	+
Leu-Tyr	+	+
Leu-Gly-Phe	+	+
Val-Trp	+	+
Arg-Asp *	-	-

* Argininhaltige Peptide sind schlecht zu reduzieren. Arginin sollte daher vorher durch Hydrazinolyse in Ornithin umgewandelt werden (9).

Je 1 mg Ala-His, Ala-Phe, Arg-Asp, Leu-Gly-Phe, Leu-Tyr, Lys-Asp und Val-Trp wurden, wie auf Seite 31 angegeben, als Gemisch in Aminoalkoholderivate umgewandelt. Nach der Reduktion wurde die Probe halbiert, die eine Hälfte über Ionenaustauscher, die andere nach Nau (Seite 25) gereinigt. Die gaschromatographische Auftrennung der reduzierten Peptidderivate wurde auf einer 1 m 2% Dexsil Säule (80-330° C, 6° C/min) vorgenommen.

Bei dem gewählten Peptidgemisch erwiesen sich beide Verfahren als gleichwertig. Für alle weiteren Versuche wurde daher nur noch das Ionenaustauschverfahren verwendet.

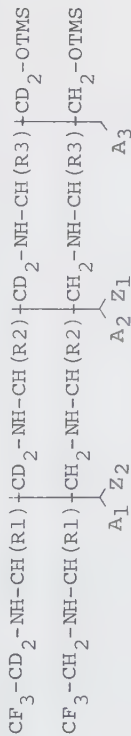
Mit dem neuen Verfahren wurden noch Diglycin, Triglycin, Tetraglycin, Pentaglycin, Gly-Pro, Pro-Hyp, Pro-Pro, Gly-Hyp und Gly-Pro-Ala untersucht.

Der Nachweis von Diglycin, Triglycin, Tetraglycin und Pentaglycin erwies sich als äusserst schwierig und ein einwandfreies Massenspektrum konnte nur für das Aminoalkoholderivat von Diglycin erhalten werden (Fig. 2, mit dem Originalverfahren nach Nau (7) gelang der Nachweis dieser Peptide nicht). Dieses entstand zu 43% (II, $R_t = 8.2$ min) neben zwei anderen Produkten, die zu 4% (A, $R_t = 8.9$ min) und 53% (B, $R_t = 9.5$ min) vertreten waren (gaschromatographische Schätzung, GC-Bedingungen: 1 m 2% Dexsil Säule, 1 min isotherm bei 80° C, 80-330° C, 8° C/min), deren Massenspektren aber nicht gedeutet werden konnten. Massenspektren, m/e (% rel. Int.) Ionen ab Masse 50:

A: 56(25), 73(6), 74(18), 75(3), 79(5), 98(3), 100(4), 126(4), 130(6), 138(6), 140(8), 144(6), 146(5), 153(20), 159(4), 166(3), 167(100), 168(9), 255(4), 269(9)

Tab. 3: Typische Fragmente aus EI-Massenspektren von Peptiden, die entweder als hydrierte (H) oder deuterierte (D) N-Trifluoräthyl-O-trimethylsilyl-aminoalkohole analysiert wurden

Das Molekularion ist praktisch nie sichtbar, hingegen ein Ion der Masse M^+-15 in einer relativen Intensität bis zu 8%. Spaltungen treten bevorzugt an der C-C Bindung der Äthylendiamineinheiten auf. Die amino- bzw. C-terminalen Fragmente werden als A- bzw. Z-Ionen bezeichnet und wie im folgenden Beispiel eines Tripeptids numeriert:



Derivate von	M^+			M^+-15			Z1	Z2	A1	A2	A3	Basis-signal
	D	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D	
Gly-Gly	258		243		146		112		155			Z1
Gly-Gly-Gly*		344		150	195		164		209		254	Z1
Gly-Hyp			371		274				283			Z1
Gly-Pro		289		190					199			Z1
Gly-Pro-Ala			340		160		243		195		252	A2
Pro-Hyp		333		278			70		243			A2-A1
cyclo-Pro-Hyp	258		243									M ⁺
Pro-Pro**		245		190			70		155			A1+16
cyclo-Pro-Pro	170											M ⁺
Ser-Ser-Ser		600		252	399		216		363		510	A2

*Als N-Pentafluorpropionyl-O-trimethylsilyl-aminoalkohol

**Reduziertes N-terminales Prolin trägt keine Trifluoräthylgruppe

Tab. 4: Namen (nach IUPAC-Nomenklatur, 40) von Aminoalkohol-derivaten, die aus reinen Peptiden hergestellt wurden

- I 11-(2,2-Dideuterio-3,3,3-trifluor-1-aza-propyl)-5,8-bis-(3,3-dimethyl-2-oxa-3-sila-butyl)-4,4,7,7,10,10-hexadeuterio-2,2,14,14-tetramethyl-3,13-dioxa-6,9-diaza-2,14-disila-pentadecan
- II 2,2-Dimethyl-11,11,11-trifluor-3-oxa-6,9-diaza-undecan
- III 2-(1,1-Dideuterio-3,3-dimethyl-2-oxa-3-sila-butyl)-1-(1,1,4,4-tetradeuterio-5,5,5-trifluor-3-aza-pentyl)-pyrrolidin
- V 2-(1,1-Dideuterio-3,3-dimethyl-2-oxa-3-sila-butyl)-4-(2,2-dimethyl-1-oxa-2-sila-propyl)-1,2'-dipyrrolidinyl-dideuteriomethan
- VII 2-(1,1-Dideuterio-3,3-dimethyl-2-oxa-3-sila-butyl)-1,2'-dipyrrolidinyl-dideuteriomethan
- VIII 2-(3,3-dimethyl-2-oxa-3-sila-butyl)-4-(2,2-dimethyl-1-oxa-2-sila-propyl)-1-(5,5,5-trifluor-3-aza-pentyl)-pyrrolidin
- IX 1-(5,5,5-trifluor-3-aza-pentyl)-2-(3,6,6-trimethyl-5-oxa-2-aza-6-sila-heptyl)-pyrrolidin
- X 14,14-Difluor-2,2-dimethyl-4,4,7,7,10,10,13,13-octadeuterio-15,15,15-trifluor-3-oxa-6,9,12-triaza-2-sila-pentadecan
- XI 5-Benzyl-11,11,11-trifluor-2,2,8-trimethyl-3-oxa-6,9-diaza-2-sila-undecan

B: 56(6), 70(4), 73(11), 74(4), 75(3), 101(1), 112(1),
116(3), 117(4), 126(1), 130(4), 138(3), 140(1), 144(15),
145(2), 146(2), 152(3), 153(5), 154(2), 160(1), 164(2),
167(1), 172(3), 179(1), 181(53), 182(4), 225(1), 265(1),
269(100), 270(18), 283(5), 284(1), 395(1)

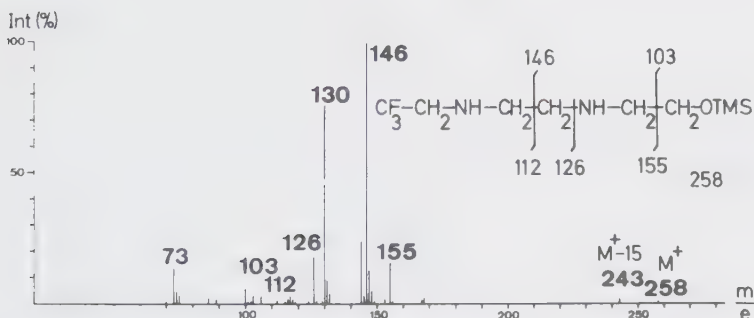


Fig. 2: Electron impact Massenspektrum bei 20 eV von hydriertem Gly-Gly (II, als N-Trifluoräthyl-O-trimethylsilyl-amino-alkohol)

Um die Reduktion näher untersuchen zu können, wurde der Trifluoracetyl-diglycin-methylester (TFA-Gly-Gly-OCH₃) präparativ dargestellt:

10 g Diglycin (0.059 Mol) in 500 ml Methanol wurden in einem Eis/Methanol-Gemisch gekühlt und innert 20 min 250 ml Thionylchlorid zugetropft. Die innert weniger Minuten entstandene Lösung wurde 60 min zwischen -10 und 0° C gehalten, am Rotationsverdampfer eingengt und der ölige Rückstand in 50 ml Methanol und 20 ml Essigsäureäthylester heiss gelöst. Diese Lösung wurde über Nacht bei 0° C gehalten, die entstandenen Kristalle mit Diäthyläther nachgespült und über Phosphorpentoxid getrocknet. Ausbeute: 9 g $\hat{=}$ 83%. Methylester (2 g $\hat{=}$ 0.01 Mol) in 40 ml Dichlor-

methan wurden auf 0°C gekühlt und innert 5 min zwischen $0-10^{\circ}\text{C}$ 8.4 ml Trifluoressigsäureanhydrid zugetropft. Die Lösung wurde 30 min bei 5°C gehalten und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde in 9 ml Methanol heiss gelöst und bei 0°C kristallisieren gelassen. Die Kristalle wurden filtriert und über Phosphorpentoxid getrocknet. Ausbeute: 1 g $\hat{=}$ 38%, Smp. 142°C . Dünnschicht (Kieselgel, Essigsäureäthylester/Methanol 1:1): R_f -Wert = 0.36. Massenspektrum, m/e (% rel. Int.): M^{+} : 282 (1); 6 intensivste Ionen ab Masse 50: 127(100), 88(92), 116(91), 126(39), 183(12), 59(8)

$^1\text{H-NMR}$ (s = Singulett, d = Dublett, b = breites unstrukturiertes Signal): 3.793/ s ($-\text{CH}_3$), 4.098/2 d (4H), 6.297/ b ($-\text{NH}-$), 7.223/ b ($-\text{NH}-$)

Aber auch mit diesem reinen Edukt wurden in schlechter Ausbeute dieselben drei Produkte erhalten wie auf Seite 34 angegeben. Wir untersuchten deshalb die Reduktionsprodukte mit HEP. Dazu wurde die Aufarbeitung des Reduktionsgemischs nach Nau (7) durchgeführt.

Zu einer reduzierten Probe von 5 mg TFA-Gly-Gly- OCH_3 in 3 ml 0.25 M LiAlH_4 wurde unter Eiskühlung 5 ml Methanol getropft. Unter starkem Rühren wurde mit 7 Tropfen Wasser Aluminiumhydroxid ausgefällt. Das Präzipitat wurde filtriert und der Rückstand in 20 ml heissem Methanol 15 min beschallt. Die Suspension wurde filtriert und der Filterrückstand erneut in 20 ml heissem Methanol beschallt. Nach Filtration der Suspension wurden die beiden Methanol-Extrakte vereinigt, zur Trockne eingedampft und der Rückstand zweimal 20 min in 30 ml Chloroform beschallt. Die vereinigten, filtrierten Chloroform-Extrakte wurden eingedampft, in 1 ml Wasser gelöst und 10 μl dieser Lösung zur Elektrophorese aufgetragen (pH 1.9, 17 min, 4'000 V, für Ninhydrinfärbung siehe Abschn. 2.2.1).

Die Färbung mit Ninhydrin zeigte verwaschene Zonen, wie es für Polymere charakteristisch ist.

Auch das Verhalten von TFA-Gly-Gly-Gly-OCH₃ bei der Reduktion wurde untersucht. Dazu wurde diese Verbindung präparativ hergestellt.

Triglycin (4 g $\pm$ 0.021 Mol) in 200 ml Methanol wurden in einem Eis/Methanol-Gemisch gekühlt und innert 50 min 100 ml Thionylchlorid zuge tropft. Die innert weniger Minuten entstandene Lösung wurde 40 min bei -5° C gehalten, am Rotationsverdampfer eingeengt und der ölige Rückstand in 5 ml Essigsäureäthylester und 70 ml Methanol heiss gelöst. Diese Lösung wurde über Nacht bei 0° C gehalten, die entstandenen Kristalle filtriert, mit eiskaltem Methanol nachgespült und über Phosphorpentoxid getrocknet. Ausbeute: 3 g $\pm$ 59%. Methylester (2 g $\pm$ 8.4 mMol) in 40 ml Dichlormethan wurden auf 0° C gekühlt und innert 5 min zwischen 0-10° C 9 ml Trifluoressigsäureanhydrid zugetropft. Die Mischung wurde 2 h bei 0° C gerührt. Die entstandene Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeengt, der Rückstand in 70 ml Methanol heiss gelöst und über Nacht bei 0° C kristallisieren gelassen. Die Kristalle wurden filtriert und über Phosphorpentoxid getrocknet. Ausbeute: 1.3 g $\pm$ 48%. Dünnschicht (Kieselgel, Essigester): R_F-Wert = 0.2. Massenspektrum, m/e (% rel. Int.): M⁺ : 299 (6), 6 intensivste Ionen ab Masse 50: 184(100), 173(25), 127(21), 113(18), 211(12), 71(11)

Die Reduktion mit LiAlH₄ lieferte aber mehrere Produkte, die sich gaschromatographisch nicht trennen liessen (R_t = 19.5 min, 1 m 2% Dexsil Säule, 1 min isotherm bei 80° C, 80-330° C, 8° C/min). Das Massenspektrum des hydrierten TFA-Gly-Gly-Gly-OCH₃ enthielt deshalb Fremdionen. Unter diesen befanden sich intensive Signale bei m/e 167 und 181, die auch in den Nebenprodukten von hydriertem TFA-Gly-Gly-OCH₃

(Seite 34) aufgetreten waren.

Nach Veresterung, Trifluoracetylierung und Reduktion von Tetraglycin und Pentaglycin wurden praktisch keine gaschromatographischen Signale erhalten.

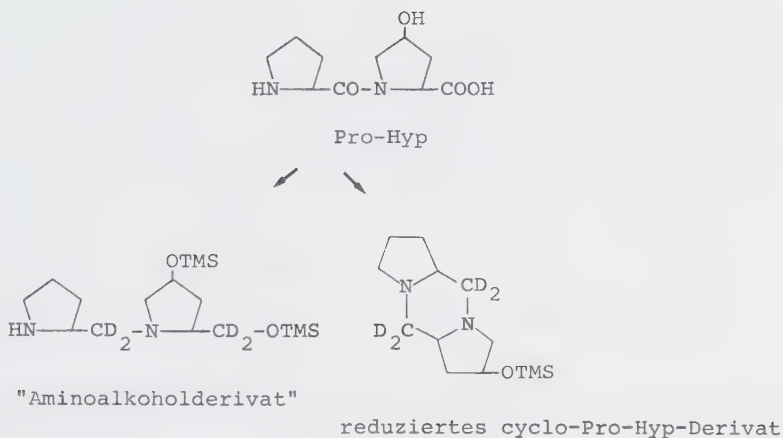
Bei der Trifluoracetylierung von Gly-Pro und Pro-Hyp zyklisierten die beiden Verbindungen zum Teil (Abschn. 2.2.2).

Nach Reaktion mit LiAlD_4 waren also auch die reduzierten cyclo-Peptide zu erwarten.

Die Reduktion des Rückstandes aus der Trifluoracetylierung lieferte bei Gly-Pro variable und sehr kleine Ausbeuten am Aminoalkoholderivat (III, $R_t = 20.8$ min, 1 m 2% SE 30 Säule, 6 min isotherm bei 80°C , $80-250^\circ\text{C}$, 6°C/min). Das Massenspektrum der reduzierten Verbindung ist in Fig. 15 abgebildet. Reduziertes TFA-cyclo-Gly-Pro konnte unter den angewendeten GC-Bedingungen nicht erfasst werden.

Bei Pro-Hyp entstand neben dem Aminoalkoholderivat (V, $R_t = 15$ min, 1 m 2% Dexsil Säule, 6 min isotherm bei 80°C , $80-330^\circ\text{C}$, 8°C/min) vor allem das reduzierte cyclo-Pro-Hyp-Derivat ($R_t = 13.2$ min), und zwar hatten die gaschromatographischen Peaks ein Verhältnis von 1:3.

Die Massenspektren der beiden Verbindungen sind in Fig. 11 und 12 abgebildet.



Bei Pro-Pro entstand nach Reduktion neben dem erwarteten Aminoalkoholderivat (VII, 76.5%, $R_t = 13$ min, 1 m 2% SE 30 Säule, 5 min isotherm bei 100°C , $100-280^\circ\text{C}$, 10°C/min) das reduzierte cyclo-Pro-Pro ($R_t = 9.3$ min) zu 9% und ein weiteres nicht identifiziertes Nebenprodukt ($R_t = 12.7$ min) zu 14.5%. Die Massenspektren des deuterierten O-Trimethylsilyl-aminoalkohols von Pro-Pro und des reduzierten cyclo-Pro-Pro sind in Fig. 3 und 4 abgebildet, das Massenspektrum des nicht identifizierten Produktes war von Ionen des Hauptproduktes überlagert.

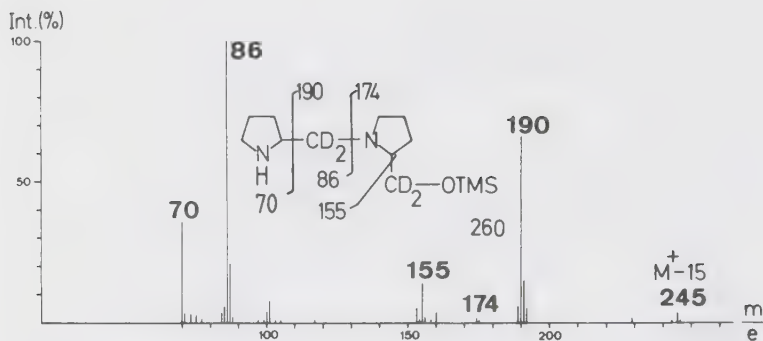


Fig. 3: Electron impact Massenspektrum bei 20 eV von deuteriertem Pro-Pro (VII, als *O*-trimethylsilyl-aminoalkohol). Reduziertes N-terminales Prolin trägt keine Trifluoräthylgruppe

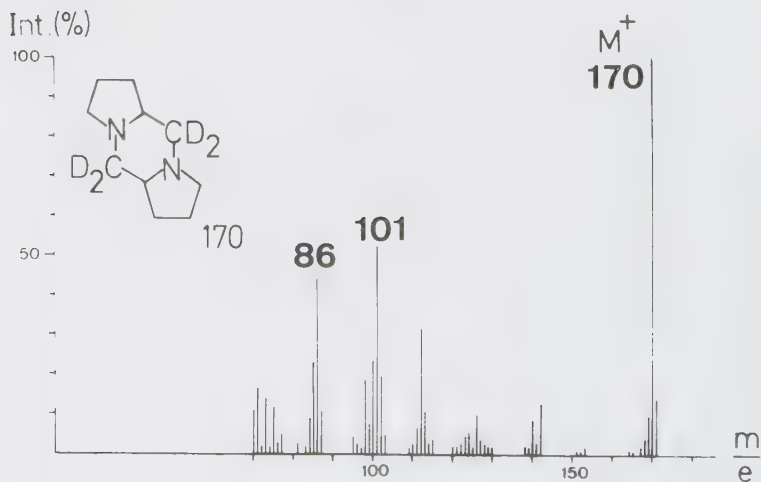


Fig. 4: Electron impact Massenspektrum bei 20 eV des bei der Derivatisierung von Pro-Pro als Nebenprodukt entstandenen cyclo-Pro-Pro-Derivats

Gly-Hyp zeigte im Gegensatz zu Gly-Pro, Pro-Hyp und Pro-Pro keine Diketopiperazinbildung, obwohl sie auch hier zu erwarten gewesen wäre. Die Aminoalkoholderivate von Gly-Hyp (VIII, $R_t = 13.6$ min, 1 m 2% SE 30 Säule, 6 min isotherm bei 80°C , $80\text{--}250^\circ\text{C}$, 10°C/min . Massenspektrum siehe Fig. 6) entstanden in guter Ausbeute und ohne Nebenprodukte.

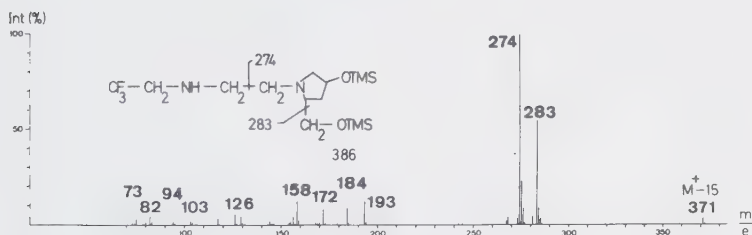


Fig. 5: Electron impact Massenspektrum bei 20 eV von hydriertem Gly-4Hyp (VIII, als N-Trifluoräthyl-O-trimethylsilyl-aminoalkohol)

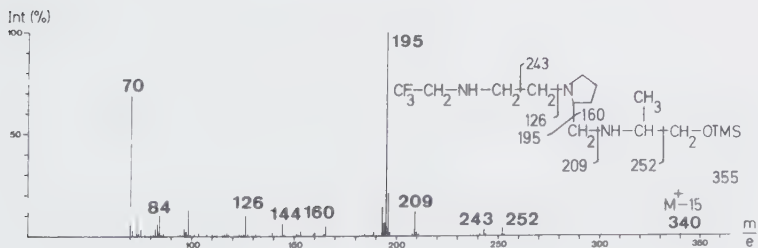


Fig. 6: Electron impact Massenspektrum bei 20 eV von hydriertem Gly-Pro-Ala (IX, als N-Trifluoräthyl-O-trimethylsilyl-aminoalkohol)

Bisher waren als Edukt für die Reduktion TFA-peptid-methylester verwendet worden. Es wurde untersucht, ob sich die PFP-peptid-hexafluorisopropylester bzw. TFA-peptid-hexafluorisopropylester ebenso als Edukte für die Reduktion eignen.

Die Reduktion von PFP-Gly-Gly-OCH(CF₃)₂ bzw. TFA-Gly-Gly-OCH(CF₃)₂ ergab die erwarteten Aminoalkoholderivate in kleiner Ausbeute. Mit PFP-Gly-Gly-Gly-OCH(CF₃)₂ konnte aber erstmals ein Aminoalkoholderivat von Triglycin einwandfrei nachgewiesen werden (X, Fig. 7).

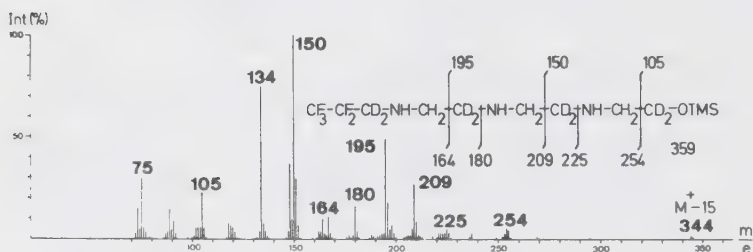


Fig. 7: Electron impact Massenspektrum bei 20 eV von deuteriertem Gly-Gly-Gly (X, als N-Pentafluorpropionyl-O-trimethylsilyl-aminoalcohol)

Für dieses Tripeptid ist das PFPAA/HFIP-Verfahren der Methode mit Thionylchlorid/Methanol und TFAA (Abschn. 2.2.2) überlegen.

Ausserdem wurden die Aminoalkoholderivate eines Peptidgemischs verglichen, das einerseits mit TFAA/HFIP und andererseits mit Thionylchlorid/Methanol/TFAA verestert und acyliert wurde. Wie Tab. 5 zeigt, ergab sich qualitativ kein Unterschied.

Tab. 5: Qualitativer Vergleich der Derivatisierung eines Peptidgemischs mit SOCl_2 /Methanol/TFAA und TFAA/HFIP nach Reduktion. GC-Bedingungen waren: 1 m 2% SE 30 Säule, $100-270^\circ \text{C}$, 10°C/min

Gemisch bestehend aus (je 1 mg)	Als Aminoalkoholderivat nachgewiesen	
	SOCl_2 /TFAA u. Red.	TFAA/HFIP u. Red.
Ala-Phe	+	+
Lys-Asp	+	+
Leu-Tyr	+	+
Leu-Gly-Phe	+	+
Val-Trp	+	+
Arg-Asp	-	-

Die Anwendung von TFAA/HFIP auf Urin war aber nicht erfolgreich:

100 ml Urin (M.L.) wurden über Dowex 50W X8 gereinigt und das Eluat in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde nach dem Eindampfen mit Thionylchlorid/Methanol verestert und mit TFAA acyliert (Abschn. 3.1.2), die andere mit 8 ml TFAA/HFIP 2:1 v/v bei 20°C umgesetzt. Beide Teile wurden dann parallel reduziert und aufgearbeitet (Abschn. 3.1.2). Während die mit TFAA/HFIP derivatisierte Probe keine gaschromatographischen Peaks ergab, konnten mit der anderen Probe Gly-Pro, Glu-Hyp, Phe-Hyp, Pro-Hyp, Gly-Pro-Hyp, Gly-Hyp-Hyp und Gly-Pro-Hyp-Gly nachgewiesen werden (vgl. dazu Fig. 9).

2.2.3.2 Diboran

In vorläufigen Versuchen wurde Ala-Phe und eine durch Fraktionierung über Dowex 50W X8 gewonnene Urinprobe, die Gly-Pro-Hyp, Gly-Hyp-Hyp und Gly-Pro-Hyp-Gly enthielt, mit Diboran reduziert.

Diboran wurde nach Zweifel und Brown (41) hergestellt, die Reduktion erfolgte nach Frank und Mitarbeiter (42).

Zu ca. 1 mg Peptid in einem Hydrolyserohr (10 x 1 cm) wurde 2 ml 0.5 M Diboran in Tetrahydrofuran gegeben. Das Hydrolyserohr wurde zugeschmolzen und 30 min bei 90° C gehalten. Zur Zerstörung des Boran-Uberschusses wurde das Rohr abgekühlt, geöffnet und bei 0° C vorsichtig solange Methanol zugetropft, bis sich kein Wasserstoffgas mehr bildete. Die Lösung wurde mit Stickstoff trocken geblasen und der Rückstand in 0.1 ml 1 M HCl in Methanol aufgelöst, das Hydrolyserohr wieder zugeschmolzen und der Inhalt 30 min auf 90° C erhitzt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt, um die Borkomplexe der Aminoalkoholderivate vollständig zu zerstören. Nach erneutem Abblasen zur Trockne wurde der Rückstand in 0.2 ml 25% Kaliumcarbonatlösung aufgenommen und dreimal mit 0.5 ml Dichlormethan extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt, trocken geblasen und der Rückstand mit 0.2 ml Diäthylamin und 0.1 ml TMSDEA 60 min bei 55° C trimethylsilyliert. 1 µl dieser Lösung wurde zur Analyse mit GC-MS verwendet.

Der Nachweis der Peptide gelang gut.

Ala-Phe (XI): $R_t = 9$ min (1 m 2% SE 30 Säule, 5 min isotherm bei 150° C, 4° C/min), Massenspektrum m/e (% rel. Int.):
typische Ionen: 347 ($M^+ - 15$, 5), 271 ($M^+ - 91$, 33), 259 (A_2 , 44), 236 (Z_1 , 100), 181 ($M^+ - 91 - 90$, 41), 126 (A_1 , 8), 120 (22), 117 (33), 91 (33).

Die Massenspektren der Hyp-Peptide sind in Fig. 10, 16 und 17 abgebildet.

2.3 Diskussion

Die Veresterung mit Methanol/Thionylchlorid bewirkte nur bei Gly-Pro die Bildung eines Nebenproduktes, in den andern untersuchten Fällen (Diglycin, Triglycin, Tetraglycin, Pentaglycin und Pro-Hyp, Abschn. 2.2.1) konnte keine Nebenreaktion oder Spaltung einer Peptidbindung nachgewiesen werden. Während sich die Veresterung mit Methanol/Thionylchlorid als zufriedenstellend erwies, wurde bei der Trifluoracetylierung von Gly-Pro, Pro-Hyp und Pro-Pro (Abschn. 2.2.2) die Bildung von Diketopiperazinen festgestellt. Bei Gly-Pro waren nach Veresterung und Trifluoracetylierung 4 Produkte entstanden, wovon 2 nicht identifiziert werden konnten. Das Entstehen von Nebenprodukten bei der Trifluoracetylierung wurde schon von Weygand und Mitarbeitern beschrieben, und zwar wurde über das Auftreten von Anhydriden, die Spaltung und die Trifluoracetylierung von Peptidbindungen berichtet (43). Auch Young und Desiderio beobachteten eine zeitabhängige Bildung von Nebenprodukten mit TFAA und weniger ausgeprägt mit PFPA (12). Derartige Nebenreaktionen sind kaum zu vermeiden, sie scheinen aber in den meisten Fällen nicht bedeutend zu sein. In diesem Lichte betrachtet könnte auch die Reaktion mit TFAA/HFIP im Eintopfverfahren (Abschn. 2.2.2) optimiert werden. Die Bildung von Nebenprodukten bei Diglycin, Triglycin und Gly-Hyp kann durch Variation der Zusammensetzung von PFPA/HFIP bzw. TFAA/HFIP und der Temperatur vermutlich gesteuert werden. Obwohl der Nachweis von Urinpepti-

den nach Derivatisierung mit TFAA/HFIP (Seite 45) misslang, so gelang doch die Identifizierung eines Peptidgemischs (Tab. 5) und bei Triglycin war der PFP-trifluorisopropylester ein günstigeres Edukt für die Reduktion als der TFA-methylester (Seite 44).

Für die Reduktion mit LiAlH_4 ist das Lithiumion ein entscheidender Faktor. Wenn die Lithiumionen in Form von Kryptaten aus dem Reaktionsmilieu entfernt wurden, fand keine Reduktion mehr statt (44). Wurden die Lithiumionen durch Natriumionen ersetzt, so war die Reduktion in aprotischem Milieu weniger effektiv (45), dasselbe Phänomen wurde aber auch beobachtet, wenn Reduktionen mit LiBH_4 und NaBH_4 in protischen Lösungsmitteln miteinander verglichen wurden (46). Dieser Effekt wird dadurch erklärt, dass Lithiumionen stärker mit dem Carbonylsauerstoff koordinieren als Natriumionen und dass damit der Hydridtransfer erleichtert wird (47). Neben dieser wichtigen Funktion des Lithiumions für die Reduktion spielen aber auch sterische Faktoren der zu reduzierenden Verbindung eine wesentliche Rolle. Bei der Reduktion von Peptiden wird die Zugänglichkeit einer Carbonylgruppe stark von der Grösse der benachbarten Aminosäurereste abhängen.

Prinzipiell sind vom tetraedrischen Zwischenprodukt des C-Atoms der Peptidbindung ausgehend die Spaltung von Kohlenstoff-Sauerstoff- und Kohlenstoff-Stickstoffbindungen möglich (48). Die Spaltung von C-N-Bindungen in Amiden mit LiAlH_4 ist schon beschrieben worden (48,49). Bei Gly-Gly und Gly-Pro (Abschn. 2.2.3.1) konnte keine Spaltung von Peptidbindungen nachgewiesen werden, weil die Spaltprodukte unter

den verwendeten GC-Bedingungen nicht erfasst werden. Bei Gly-Pro ist aber die Spaltung der Peptidbindung wahrscheinlich.

Ueber die Spaltung von C-F-Bindungen in Fluoracetamidderivaten (50), aber auch über die Bildung von Polymeren bei polyfunktionellen Molekülen (51,52) wurde berichtet. Das Aluminium in LiAlH_4 kann Quervernetzung polyfunktioneller Moleküle während der Reduktion bewirken. Die entstehenden Polymeren präzipitieren und werden dadurch der Reduktion entzogen (51). Vermutlich bildeten sich bei Diglycin Polymere (Seite 38). Es entstanden aber noch andere Nebenprodukte, deren Identifizierung nicht gelang (Seite 34 ff).

Im allgemeinen gelang die Reduktion von Peptidderivaten mit LiAlH_4 gut. Ausnahmen bildeten Arg-Asp (Tab. 2), Gly(-Gly)_n (Seite 34 ff) und Gly-Pro (Seite 40). Trp-Trp konnte in einem Peptidgemisch (Tab. 1) nicht nachgewiesen werden. Während Arg-Asp schlecht zu reduzieren ist (9), liegt der Grund für den misslungenen Nachweis von Trp-Trp vermutlich im hohen Siedepunkt des Aminoalkoholderivats (Seite 51).

Dem Diboran wird in bezug auf C-N- (48,51), C-F-Spaltungen (50) und Polymerenbildung (52) ein günstigeres Verhalten attestiert. Bei Dicarbonsäuren und Hydroxycarbonsäuren wurden aber auch mit Diboran unlösliche, polymere Produkte beobachtet (49). Mit Diboran ist eine ähnliche Präzipitierung von polyfunktionellen Molekülen möglich, wie sie für LiAlH_4 erwähnt wurde.

Bei der Reduktion von Peptiden mit LiAlH_4 erhielten Biemann und Mitarbeiter (8) Aminoalkoholderivate in gaschromatogra-

phisch geschätzten Ausbeuten von 30-95%. Auch das Diboran lieferte für Dipeptide mit aromatischen Aminosäuren Ausbeuten von etwa 85% (8); wurden aber Peptide mit Aminosäuren wie Lys, Thr, Asp und Met eingesetzt, so ergaben sich schlechtere Ausbeuten als mit LiAlD_4 . Dies kann auf die extreme Stabilität der Borkomplexe mit Aminoalkoholen zurückgeführt werden, die nur durch Hydrolyse bei erhöhter Temperatur gespalten werden können. Diese Behandlung kann Verluste durch teilweise Zerstörung der Seitenketten von Aminosäuren bewirken, die säureempfindlich sind (8). Frank und Mitarbeiter (42,52) geben dem Diboran den Vorzug, weil bessere Ausbeuten erhalten werden sollen als mit LiAlD_4 . Es muss aber darauf hingewiesen werden, dass in den beiden zitierten Arbeiten nur wenige einfache Peptide und keine komplexen Gemische untersucht wurden.

In den untersuchten Beispielen (Ala-Phe, gereinigte Urinprobe mit Gly-Pro-Hyp, Gly-Hyp-Hyp, Gly-Pro-Hyp-Gly, Abschn. 2.2.3.1) gelang der Nachweis der Peptide nach Reduktion mit Diboran. Vorteile von Diboran sind die kürzere Reduktionszeit (4 h gegenüber 36 h mit LiAlH_4 oder LiAlD_4) und die einfachere Derivatisierung (nur die Aminogruppe muss geschützt werden).

Die untere Grenze der zum Nachweis mit der Reduktionsmethode benötigten Peptidmenge wird für LiAlD_4 im Bereich von 2-5 nMol angegeben (8), während sie für Diboran bei 0.2 nMol liegt (42). Da aber die Aminoalkoholderivate in unterschiedlichen Ausbeuten anfallen (8,36), muss in den meisten Fällen wesentlich mehr eingesetzt werden. Es muss an dieser Stelle auch erwähnt werden, dass komplexe His-Peptide im Gaschroma-

togramm als breite Banden eluieren oder gar nicht erscheinen und im Direkteinlass bestimmt werden müssen (9,31) und dass z.B. Trp-Trp-Trp nicht mehr gaschromatographierbar ist (53). Die grössten Peptide, die mit der Reduktionsmethode noch bestimmt werden können, dürften im idealen Falle aus 8 Aminosäuren bestehen.

Razemisierung könnte bei der Veresterung, der Trifluoracetylierung und der Reduktion auftreten. Die Thionylchloridveresterung wurde bei Aminosäuren untersucht und gab die optisch reinen Ester (54). Auch die Trifluoracetylierung bewirkte unter geeigneten Bedingungen keinen Verlust der optischen Aktivität von Aminosäuren (55). Die Reduktion von Leucin mit Diboran, Natriumborhydrid und LiAlH_4 zeigte keine bedeutende Razemisierung (56). Bei sorgfältiger Derivatisierung sollte also die optische Aktivität der Peptide erhalten bleiben.

3. ANWENDUNG AUF URIN

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Urinproben

Alle Urine stammten von Personen mit normaler Kost, also ohne Gelatinebelastung (Tab. 6).

3.1.2 Reinigung und Derivatisierung von Urinpeptiden (Fig. 8)

Das Verfahren wird hier für 100 ml Urin beschrieben. Es wurden aber auch Mengen von 5 ml, 20 ml, 30 ml und 50 ml erfolgreich verwendet. Bei den kleineren Mengen wirkte sich aber ein organischer Background störend auf die Interpretation der Massenspektren aus.

100 ml Urin wurde mit konzentrierter Salzsäure auf pH 2.5 gestellt und auf eine Dowex 50W X8 Säule, 200-400 mesh, (5 x 17 cm) gegeben. Mit 1 Liter Wasser wurden Neutralstoffe und Säuren herausgewaschen. Die Aminosäuren und Peptide wurden mit 1.5 Liter 1 M Ammoniak eluiert. Diese Fraktion wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt und unter Rühren zwischen -10 und -20°C mit 20 ml Thionylchlorid/Methanol (9:1 v/v) 30 min verestert. Nach Zugabe von 10 ml Benzol wurde die Lösung zur Trockne eingedampft. Zur Acylierung wurde 5 ml Trifluoressigsäureanhydrid zum Trockenrückstand gegeben und 45 min bei Raumtemperatur gerührt. Für die Reduktion wurden je 0.7 ml des Ueberstandes aus der Trifluoracetylierung in zwei Hydrolyserohre transferiert und mit Stickstoff trocken geblasen. Dann wurde ein in Glas eingeschmolzener Magnetrührer zugegeben und bei 0°C unter Rühren 45 ml des klaren Ueberstandes einer 0.25 M Lithiumaluminiumhydrid- bzw. Lithiumaluminiumdeuteridlösung in Dimethoxyäthan zugetropft. Nach Zuschmelzen der Hydrolyserohre wurden

Tab. 6: Verwendete Urine zur Peptidbestimmung

Name	Diagnose	Geschl.	Geb.dat.	U r i n		
				Sammel- datum	Sammelperiode 24 h oder Portion	Kreatinin mg/dl
M.A.	Gesund	w	13. 7.40	16. 2.77	1260 ml/24 h	87
N.I.	Gesund	m	1.11.71	Sept. 78	440 ml/24 h	88
M.F.*	Epilepsie, vermuteter Peptidasemangel	m	23. 3.76	18.10.77	640 ml/24 h	12
M.L.*	Vermuteter Peptidase- mangel	m	17. 4.67	24. 2.77	1360 ml/48 h	103
R.G.	Epilepsie unklarer Genese	m	15. 6.74	11.12.77	400 ml/24 h	42
B.E.	Idiopathische gingivale Fibromatose	m	31. 8.52	6. 3.72	1942 ml/24 h	38
T.F.	Mannosidose	w	31. 3.74	2.10.78	50 ml/Port.	63
Ma.L.	Cardiomyopathie	m	6. 9.68	23. 1.78	1750 ml/24 h	63
W.M.	Rachitis und Fanconi Syndrom	w	16. 9.53	11. 2.69	24 h	25

*Brüder

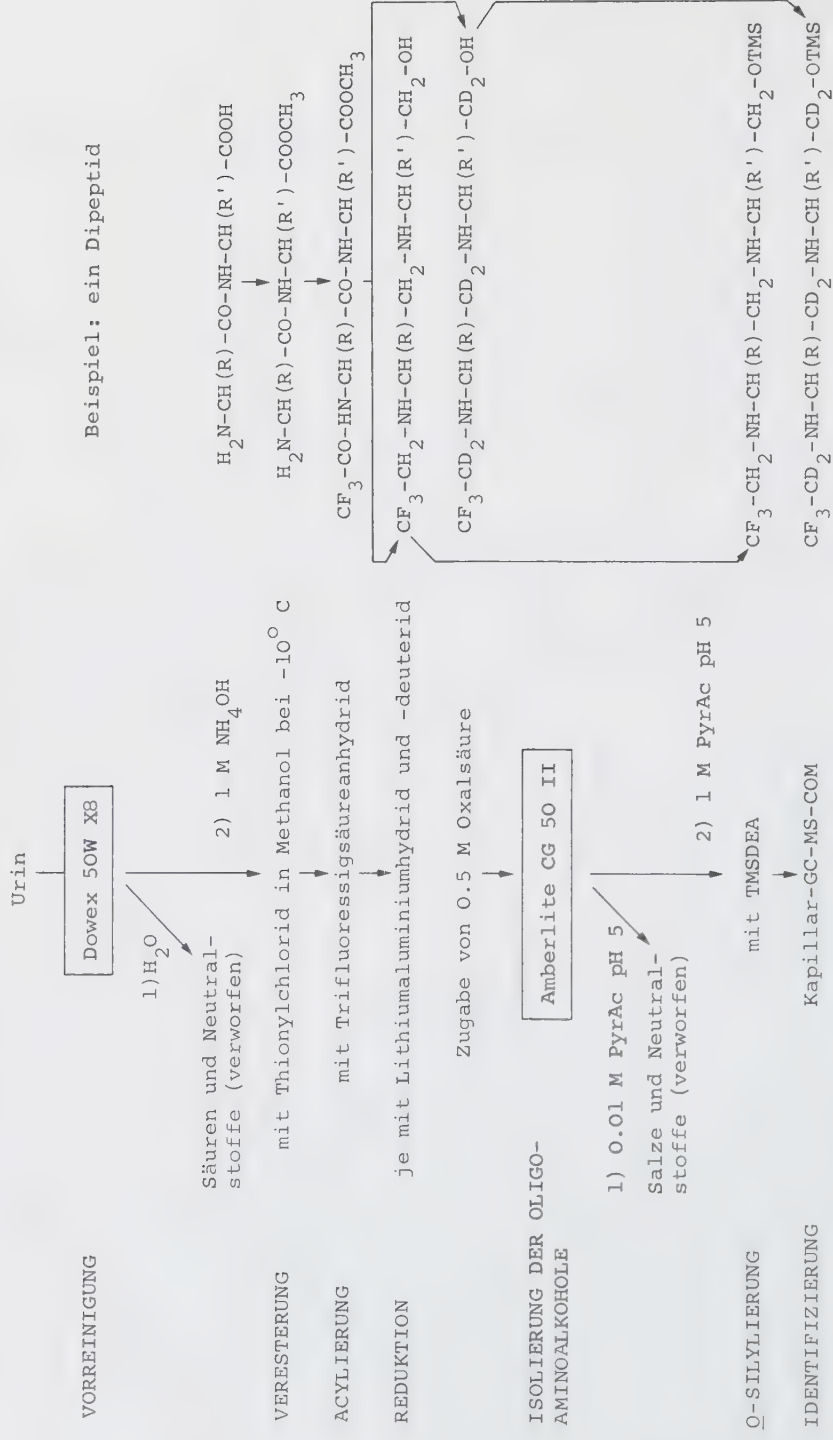


Fig. 8: Schema der Vorreinigung und Derivatisierung von Urin

die Proben 12 Stunden bei 4⁰ C und 24 Stunden bei 70-80⁰ C gerührt. Nach Umschütten der Hydrolyserohrinhalte in zwei 500 ml Erlenmeyer wurden bei 0⁰ C je 68 ml einer 0.5 M Oxalsäure zugetropft. Mit je 4-4.5 ml Pyridin wurden die Proben auf pH 5 gestellt, mit destilliertem Wasser ad 500 ml aufgefüllt und auf eine Amberlite CG 50 II Säule (10 x 1.7 cm) aufgetragen. Mit 100 ml 0.01 M Pyridiniumacetat pH 5 wurden Salze und Neutralstoffe, mit 250 ml 1 M Pyridiniumacetat pH 5 die Aminoalkohol-derivate eluiert. Letztere Fraktion wurde unter mehrmaliger Zugabe von Wasser zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und in ein 10 ml Schliffröhrchen transferiert. Nach dem Eindampfen wurden mit Benzol/Methanol (1:3 v/v) Spuren von Wasser durch azeotrope Destillation entfernt. Die Trimethylsilylierung wurde mit 1 ml Acetonitril und 0.4 ml TMSDEA bei 55⁰ C während 60 min durchgeführt.

Die Gaschromatographie-Massenspektrometrie der Proben ist in Abschn. 2.1 beschrieben.

3.2 Resultate

3.2.1 Reduktion ohne Vorreinigung der Probe

Um Verluste von Peptiden durch Reinigungsschritte zu vermeiden, wurde anfangs versucht, zur Trockne eingedampfte Urin-Proben ohne Vorreinigung über Dowex 50W X8 zu derivatisieren. Dazu wurden Mengen von 1-100 ml Urin verwendet. Die Reduktion erwies sich aber als äusserst schwierig. Oft entstanden starke Ausfällungen und häufig war die Reduktionslösung nach 36 h Reaktionsdauer aufgebraucht (kein Schäumen bei Zugabe von 0.5 M Oxalsäure). Teilweise war das darauf zurückzuführen, dass die Urinproben nach der Trifluoracetylierung als Oel vorlagen und relativ grosse Mengen an Trifluoressigsäure

und Trifluoressigsäureanhydrid enthielten, die einen Teil des Reduktionsmittels verbrauchten. Aber auch bei genügender Menge Reduktionsmittel gelang der Nachweis von Peptiden nicht. In einem Urin (W.M., Rachitis und Fanconi Syndrom, siehe Tab. 6) gelang jedoch bei Verwendung einer 100 ml Probe der Nachweis der reduzierten Aminosäuren Lys, Phe und Tyr, die in diesem Urin in sehr hoher Konzentration vorhanden waren (abweichend von der Vorschrift wurde 60 ml und nicht 45 ml 0.25 M LiAlH_4 verwendet). Dies gab den Hinweis, dass eine Reduktion in diesem Milieu prinzipiell möglich war.

Mit diesen Resultaten war als nächster Schritt eine Reinigung des Urins naheliegend. Neutralstoffe wie z.B. Harnstoff sowie Säuren können mit einem sauren Ionenaustauscher abgetrennt werden. Harnstoff ist die Verbindung, welche am meisten Reduktionsmittel verbraucht. Aber auch praktische Vorteile waren von einer gereinigten Urinprobe für die Derivatisierung zu erwarten.

3.2.2 Deuterium/Wasserstoffmarkierung und Verwendung von chemischer Ionisation

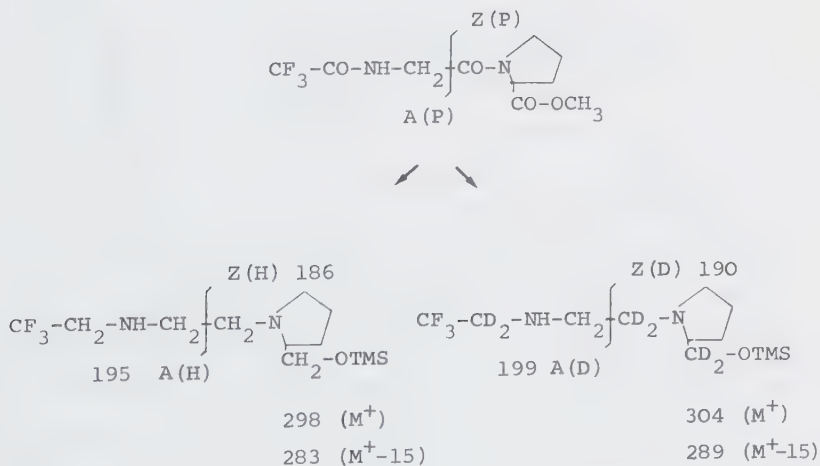
Nach Abtrennung von Neutralstoffen und Säuren über den Ionenaustauscher Dowex 50W X8 gelang der Nachweis von Peptiden im Urin mit der Reduktionsmethode. Mit Glaskapillarsäulen konnte auch eine gute gaschromatographische Trennung der Aminoalkoholderivate erhalten werden. Figur 9 stellt das Resultat einer solchen Auftrennung dar.

Schwierigkeiten bereitete aber immer noch die Interpretation von Massenspektren. Oft waren trotz guter gaschromatographi-

scher Trennung der einzelnen Komponenten verwirrende Fremdionen aus dem Background vorhanden. Als Nachteil erwies sich auch das Fehlen der M^+ - und die geringe Intensität der M^+-15 Ionen, die unter anderen Ionen schwer auszumachen sein können.

Zwei Neuerungen brachten eine entscheidende Verbesserung: einmal wurde mit CI das Molekularion der Aminoalkoholderivate eindeutig erkennbar, zum andern wurden die Peptide der Proben getrennt hydriert und deuteriert.

Mit der Reduktion von Peptiden mit $LiAlH_4$ einerseits und $LiAlD_4$ andererseits kann ein Paar von Derivaten erhalten werden, deren massenspektrometrische Fragmente sich um charakteristische Massendifferenzen unterscheiden. Eine solche Differenz hängt von der Anzahl der reduzierten $-CO$ -Gruppen in diesen Bruchstücken ab und zwar beträgt sie pro Oxogruppe 2. Für Gly-Pro z.B. wurden folgende Fragmente erhalten:



Die M^+ und M^+-15 Ionen der beiden Derivate leiten sich von der Ausgangsverbindung mit 3 -CO-Gruppen ab. Die deuterierten (D) und hydrierten (H) Ionen müssen sich daher jeweils um 6 m.u. unterscheiden. Im CI Massenspektrum wurde dies bestätigt mit M^+ (D) und M^+ (H) bei m/e 304 und 298, im CI- und EI Massenspektrum mit M^+-15 (D) und M^+-15 (H) bei m/e 289 und 283.

Z(D) und Z(H) (m/e 190 und 186) leiten sich ebenso wie A(D) und A(H) (m/e 199 und 195) von Peptidfragmenten mit 2 -CO-Gruppen ab und müssen sich daher jeweils um 4 m.u. unterscheiden.

Mit diesem Verfahren wurden neun Urine untersucht.

3.2.3 Identifizierte Urinpeptide

Ein Chromatogramm (TIC) der Urinpeptide von M.L. (als N-Trifluoräthyl-O-trimethylsilyl-aminoalkohole) ist in Figur 9 abgebildet. Das intensivste Signal stammte vom Derivat des Tetrapeptids Gly-Pro-Hyp-Gly (die Spektren der deuterierten (XII) und hydrierten (XIII) sind in Figur 10 abgebildet). Weitere Signale konnten den Aminoalkoholderivaten der Tripeptide Gly-Hyp-Gly, Gly-Hyp-Hyp, Gly-Pro-Hyp und der Dipeptide Gly-Pro, Glu-Hyp, Phe-Hyp und Pro-Hyp sowie dessen reduziertem Diketopiperazin (cyclo-Pro-Hyp) zugeordnet werden. In Tabelle 7 sind die wichtigsten Fragmente aus den Massenspektren der im Urin nachgewiesenen Peptidderivate angegeben, in Tabelle 8 die Namen nach IUPAC Nomenklatur (40). Neben diesen Peptidderivaten wurden noch die Aminosäurederivate von His, Lys, Phe und Tyr identifiziert.

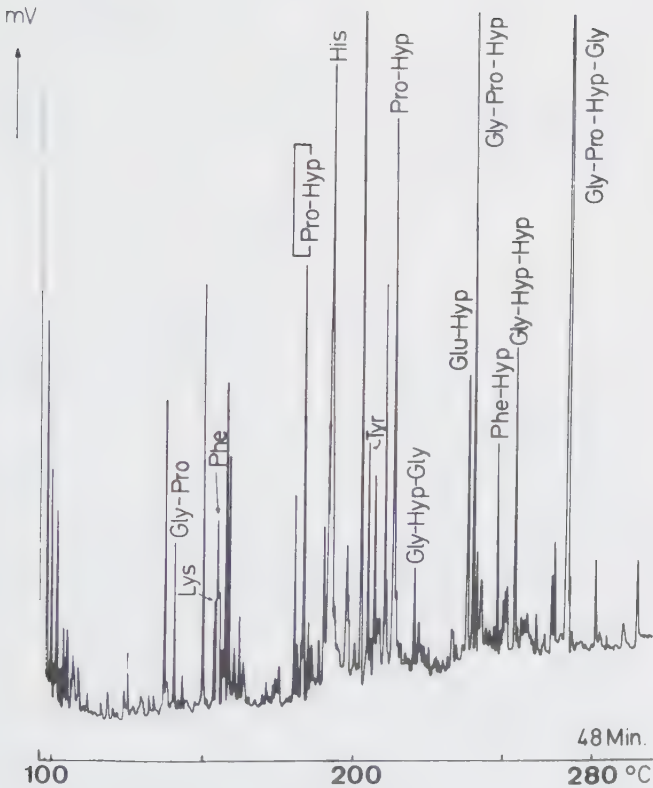


Fig. 9: Gaschromatographische Trennung von Urinpeptiden (M.L.) als deuterierte *N*-Trifluoräthyl-*O*-trimethylsilyl-oligoaminoalkohole auf einer 25 m SE 30 Glaskapillare: das Chromatogramm gibt den Totalionenstrom wieder. Die analysierte Probe entsprach 10 µl Urin. Die Konzentration des Tetrapeptids Gly-Pro-⁴Hyp-Gly war etwa 60 mg/l Urin

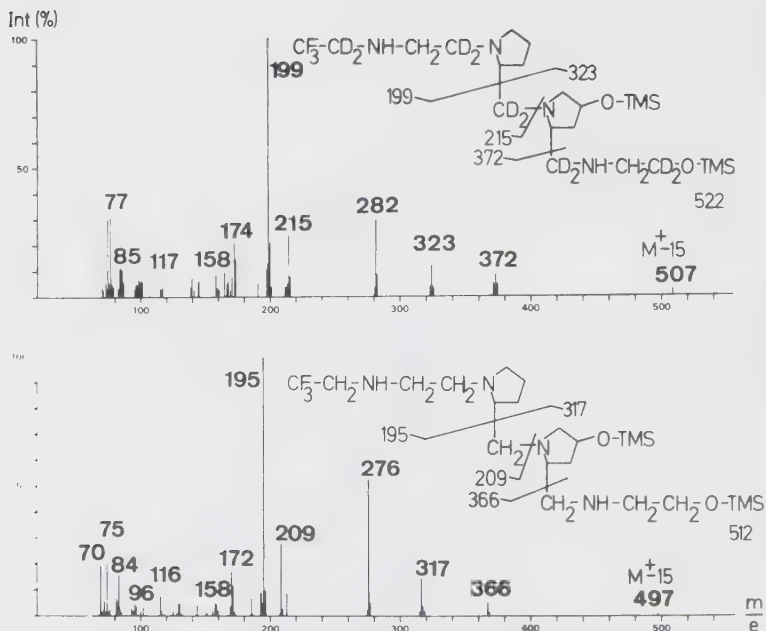


Fig. 10: Electron impact Massenspektrum bei 20 eV des im Urin gefundenen deuterierten (oben, XII) und hydrierten (unten, XIII) Tetrapeptids Gly-Pro-Hyp-Gly (als N-Trifluoräthyl-O-trimethylsilyl-aminoalkohol)

Daten: Retentionsindex (RI, (2), Lys, Phe) = 1470, RI (His) = 1710, RI (Tyr) = 1810

Massenspektren der deuterierten Verbindungen, m/e (% rel. Int.): M^{+15} , 6 intensivste Ionen ab Masse 70:

His: 284(3), 82(100), 194(99), 218(17), 83(17), 195(16), 202(12)

Lys: 359(<1), 168(100), 211(40), 269(26), 84(23), 98(11), 185(10)

Phe: 294(<1), 204(100), 218(88), 205(14), 73(14), 91(13), 219(12)

Tyr: 382(<1), 218(100), 219(18), 202(18), 292(13), 179(10), 180(6)

Es war von Interesse, eine Angabe über die ausgeschiedene Menge von Gly-Pro-Hyp-Gly machen zu können. Dazu wurde das Tetrapeptid aus Urin isoliert, dinitrophenyliert und durch Vergleich der Extinktion von diesem Derivat und Dinitrophenylglycin (DNP-Gly) die Konzentration bestimmt. Die Ausbeute der Dinitrophenylierung am Tetrapeptid wurde mit den externen Standards Diglycin, Gly-Pro und Gly-Pro-Hyp abgeschätzt.

5 ml Urin wurden eingedampft, der Rückstand in 2.1 ml Wasser gelöst, und das Urinkonzentrat zu Mengen à je 0.3 ml in 15 cm Abstand vom Blattende über eine Breite von 19 cm, mit je 0.5 cm freiem Rand auf jeder Seite, auf sieben Elektrophoresepapiere aufgetragen. Bedingungen für die HEP waren: pH 2, 17 min, 4'000 V. Von den getrockneten Chromatogrammen wurde auf beiden Seiten der Länge nach je ein Randstreifen von 2 cm abgeschnitten und mit Ninhydrin (Abschn. 2.2.1) gefärbt: das Tetrapeptid befand sich als gelbe Zone in der Glutaminsäureregion. Aus den nicht angefärbten Chromatogrammen wurden senkrecht zur Längsrichtung ca. 4 cm breite Streifen herausgeschnitten, die das Peptid enthielten. Dieses wurde mit Wasser eluiert und das Eluat zur Trockne eingedampft. Zum Rückstand wurde 2 ml Wasser, 1.4 ml absoluter Aethanol, 0.2 ml 10% Dinitrofluorbenzol in absolutem Aethanol und 0.24 ml 1 M Natriumbicarbonatlösung pH 8.8 gegeben. Das pH der Lösung wurde durch weitere Zugabe der Natriumbicarbonatlösung auf pH 8.8 gestellt. Die Reaktion verlief während drei Stunden bei Raumtemperatur in der Dunkelheit. Analog wurden 0.6 mg Gly-Gly, 0.48 mg Gly-Pro und 0.5 mg Gly-Pro-Hyp dinitrophenyliert. Die Proben wurden zur Trockne eingedampft, in 20 ml Wasser (Urin) bzw. 10 ml Wasser (Peptide) aufgenommen und dreimal mit 10 ml Diäthyläther extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden mit konzentrierter

Salzsäure auf pH 2 angesäuert und auf eine 10 g Porapak- (Urin) bzw. 1 g Porapaksäule (Peptide) aufgetragen. Nach Spülen mit etwas 0.1 N HCl wurden die am Start sitzenden gelben Banden mit Aceton/Wasser 80:20 v/v eluiert. Das Eluat der Urinprobe wurde zur Trockne eingedampft, in 70 μ l Methanol aufgenommen und in 7 Portionen durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel mit den folgenden Fließmitteln aufgetrennt:

(1) n-Butanol / Essigsäure / Wasser 80 : 20 : 20

(2) Chloroform / Methanol / Wasser / Essigsäure

50 : 40 : 10 : 1

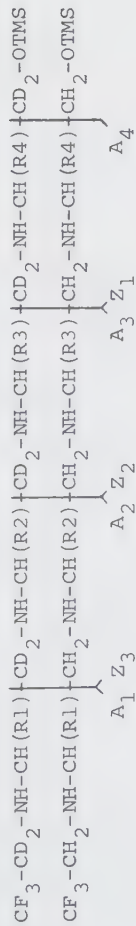
R_f -Werte von DNP-Gly-Pro-Hyp-Gly in den beiden Systemen: 0.40 bzw. 0.39. Nach Elution mit Chloroform/Methanol in allmählich steigender Methanolkonzentration (5:4, 4:6, 3:7, 2:8) wurde die Verbindung auf einer weiteren Dünnschichtplatte mit dem zweiten Fließmittel noch einmal gereinigt. Nach Eluieren und Eindampfen des Eluats, wurde das DNP-Peptid in Methanol aufgenommen und bei 260 nm gemessen. Die Konzentration wurde durch Vergleich mit der Absorption von DNP-Gly (0.083 mM, $a_c = 8.5 \times 10^8$ m² Mol⁻¹) bestimmt.

Die zur Kontrolle der Dinitrophenylierung eingesetzten reinen Peptide wurden analog behandelt und gemessen. Resultat:

DNP-Gly-Gly	36.3%	Ausbeute
DNP-Gly-Pro	33 %	Ausbeute
DNP-Gly-Pro-Hyp	35.4%	Ausbeute

Da die Ausbeuten bei diesen Testpeptiden gut übereinstimmten, wurde auch beim Tetrapeptid eine Ausbeute von 35% angenommen. Unter dieser Annahme ergab sich für das Gly-Pro-Hyp-Gly eine Menge von 60 mg/l Urin.

Tab. 7: Charakteristische Massen in den Spektren von Urinpeptiden, die als deuterierte (D) und hydrierte (H) N-Trifluoräthyl-O-trimethylsilyl-aminoalkohole analysiert wurden. Die Nomenklatur der Fragmentierung ist im folgenden Schema erklärt (vgl. auch die Legende zu Tabelle 3):



Derivate von	RI*	MH ⁺ (CI)				M ⁺ -15				Z ₁				Z ₂				A ₁				A ₂				A ₃				Basis-signal
		D	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D	H					
Gly-Pro		305	299	289	283	190	186															199	195					Z ₁		
cyclo-Pro-4Hyp	1640	259	255	243	239																									
Pro-4Hyp	1860	349	345	333	329	278	274											70	70	243	241							A ₂ -A ₁		
Glu-4Hyp	2080	525	517	509	501	278	274											246	242	419	413							Z ₁		
Phe-4Hyp	2160	483	477	467	461	278	274											204	202	377	373							Z ₁		
Gly-4Hyp-Gly	1920	438	430	422	414													323	317			287	283					A ₂		
Gly-Pro-4Hyp	2090	478	470	462	454	278	274											199	195			199	195					A ₂		
Gly-3Hyp-4Hyp	2210	566	558	550	542	278	274											451	445			287	283					A ₂		
Gly-Pro-4Hyp-Gly	2380	523	513	507	497													323	317			199	195	372	366			A ₂		

*Retentionsindex nach B. Kolb (2), alle geraden Alkane von C₁₄ bis C₂₈ wurden zur Bestimmung des RI verwendet

Tab. 8: Namen (nach IUPAC-Nomenklatur,40) von Aminoalkohol-
derivaten, die aus Urinpeptiden hergestellt wurden

III	2-(1,1-Dideuterio-3,3-dimethyl-2-oxa-3-sila-butyl)-1- -(1,1,4,4-tetradeuterio-5,5,5-trifluor-3-aza-pentyl)- -pyrrolidin
IV	2-(3,3-dimethyl-2-oxa-3-sila-butyl)-1-(5,5,5-trifluor- 3-aza-pentyl)-pyrrolidin
V	2-(1,1-Dideuterio-3,3-dimethyl-2-oxa-3-sila-butyl)-4- -(2,2-dimethyl-1-oxa-2-sila-propyl)-1,2'-dipyrrolidi- dinyl-dideuteriomethan
VI	2-(3,3-Dimethyl-2-oxa-3-sila-butyl)-4-(2,2-dimethyl- -1-oxa-2-sila-propyl)-1,2'-dipyrrolidinyl-methan
XII	4-(2,2-Dimethyl-1-oxa-2-sila-propyl)-2-(6,6-dimethyl- -1,1,4,4-tetradeuterio-5-oxa-2-aza-6-sila-heptyl)-1'- -(1,1,4,4-tetradeuterio-5,5,5-trifluor-3-aza-pentyl)- -1,2'-dipyrrolidinyl-dideuteriomethan
XIII	2-(6,6-Dimethyl-5-oxa-2-aza-6-sila-heptyl)-4-(2,2-di- methyl-1-oxa-2-sila-propyl)-1'-(5,5,5-trifluor-3-aza- -pentyl)-1,2'-dipyrrolidinyl-methan
XIV	1-(2-Benzyl-1,1,4,4-tetradeuterio-5,5,5-trifluor-3- -aza-pentyl)-2-(1,1-dideuterio-3,3-dimethyl-2-oxa-3- -sila-butyl)-4-(2,2-dimethyl-1-oxa-2-sila-propyl)- -pyrrolidin
XV	1-(2-Benzyl-5,5,5-trifluor-3-aza-pentyl)-2-(3,3-di- methyl-2-oxa-3-sila-butyl)-4-(2,2-dimethyl-1-oxa-2-si- la-propyl)-pyrrolidin

- XVI 2-(1,1-Dideuterio-3,3-dimethyl-2-oxa-3-sila-butyl)-
-1-(2-(2,2-dideuterio-3,3,3-trifluor-1-aza-propyl)-
-7,7-dimethyl-1,1,5,5-tetradeuterio-6-oxa-7-sila-octyl)-4-(2,2-dimethyl-1-oxa-2-sila-propyl)-pyrrolidin
- XVII 2-(3,3-Dimethyl-2-oxa-3-sila-butyl)-4-(2,2-dimethyl-
-1-oxa-3-sila-propyl)-1-(7,7-dimethyl-2-(3,3,3-tri-
fluor-1-aza-propyl)-6-oxa-7-sila-octyl)-pyrrolidin
- XVIII 2-(1,1-Dideuterio-3,3-dimethyl-2-oxa-3-sila-butyl)-
-4-(2,2-dimethyl-1-oxa-2-sila-propyl)-1'-(1,1,4,4-te-
tradeuterio-5,5,5-trifluor-3-aza-pentyl)-1,2'-dipyr-
rolidinyl-dideuteriomethan
- IXX 2-(3,3-Dimethyl-2-oxa-3-sila-butyl)-4-(2,2-dimethyl-
-1-oxa-2-sila-propyl)-1'-(5,5,5-trifluor-3-aza-pen-
tyl)-1,2'-dipyrrolidinyl-methan
- XX 2-(1,1-Dideuterio-3,3-dimethyl-2-oxa-3-sila-butyl)-
-3',4-bis-(2,2-dimethyl-1-oxa-2-sila-propyl)-1'-
-(1,1,4,4-tetradeuterio-5,5,5-trifluor-3-aza-pentyl)-
-1,2'-dipyrrolidinyl-dideuteriomethan
- XXI 2-(3,3-Dimethyl-2-oxa-3-sila-butyl)-3',4-bis-(2,2-di-
methyl-1-oxa-2-sila-propyl)-1'-(5,5,5-trifluor-3-aza-
-pentyl)-1,2'-dipyrrolidinyl-methan
- XXII 4-(2,2-Dimethyl-1-oxa-2-sila-propyl)-2-(6,6-dimethyl-
-1,1,4,4-tetradeuterio-5-oxa-2-aza-6-sila-heptyl)-1-
-(1,1,4,4-tetradeuterio-5,5,5-trifluor-3-aza-pentyl)-
-pyrrolidin
- XXIII 2-(6,6-Dimethyl-5-oxa-2-aza-6-sila-heptyl)-4-(2,2-di-
methyl-1-oxa-2-sila-propyl)-1-(5,5,5-trifluor-3-aza-
pentyl)-pyrrolidin

Normalerweise ist Pro-Hyp das dominante Oligopeptid im Urin (siehe Abschn. 3.3.2). Im Urin der Brüder M.F. und M.L. wurde aber Gly-Pro-Hyp-Gly als Komponente mit höchster Konzentration nachgewiesen (60 mg/l). Auf die mögliche Bedeutung der hohen Konzentration dieses Tetrapeptids wird in Abschn. 3.3.3 eingegangen.

Die Basissignale der im Urin gefundenen Aminoalkoholderivate verhielten sich mit einer Ausnahme nach der beschriebenen Regel (36), dass für Dipeptide normalerweise das Z_1 -Ion, für Tri- und Tetrapeptide das A_2 -Ion das intensivste Signal ist. Die Ausnahme bildete das Derivat von Pro-Hyp (V, VI, Fig. 11), welches als prominentestes Signal das Ion $A_2 - A_1$ enthielt, das übrigens in allen von uns untersuchten reduzierten Hyp-Peptiden zu finden war. Wie Fig. 11 zeigt, ist das Z_1 -Ion aber das zweitintensivste Signal.

Bei Pro-Hyp (Abschn. 2.2.2) wurde festgestellt, dass Ringbildung bei der angewandten Derivatisierung unvermeidlich ist. Im Urin konnten daher auch deuteriertes und hydriertes cyclo-Pro-Hyp (Fig. 12) nachgewiesen werden.

Ein ungewöhnliches Bild boten die Spektren von deuteriertem und hydriertem Phe-Hyp (XIV, XV, Fig. 13), die praktisch nur das Z_1 -Ion enthielten und die übrigen Sequenzionen fast vollständig unterdrückt zeigten.

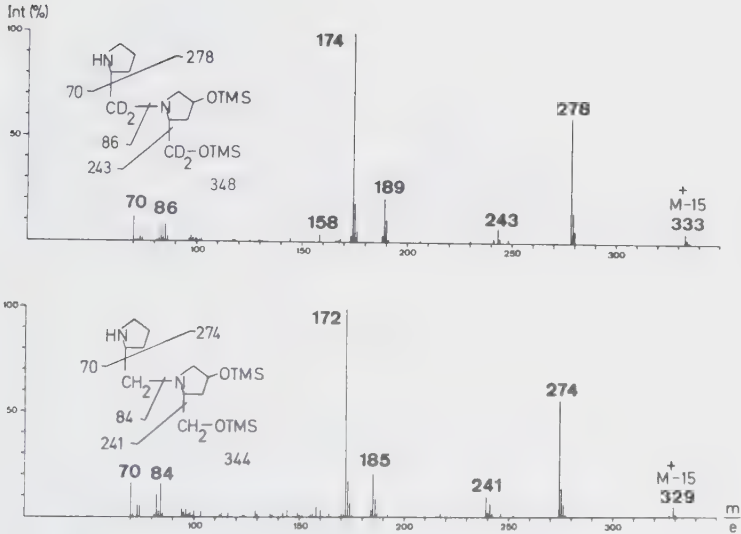


Fig. 11: Electron impact Massenspektrum bei 20 eV des im Urin gefundenen deuterierten (oben, V) und hydrierten (unten, VI) Dipeptids Pro-Hyp (als *O*-trimethylsilyl-aminoalkohol). Reduziertes N-terminales Prolin trägt keine Trifluoräthylgruppe

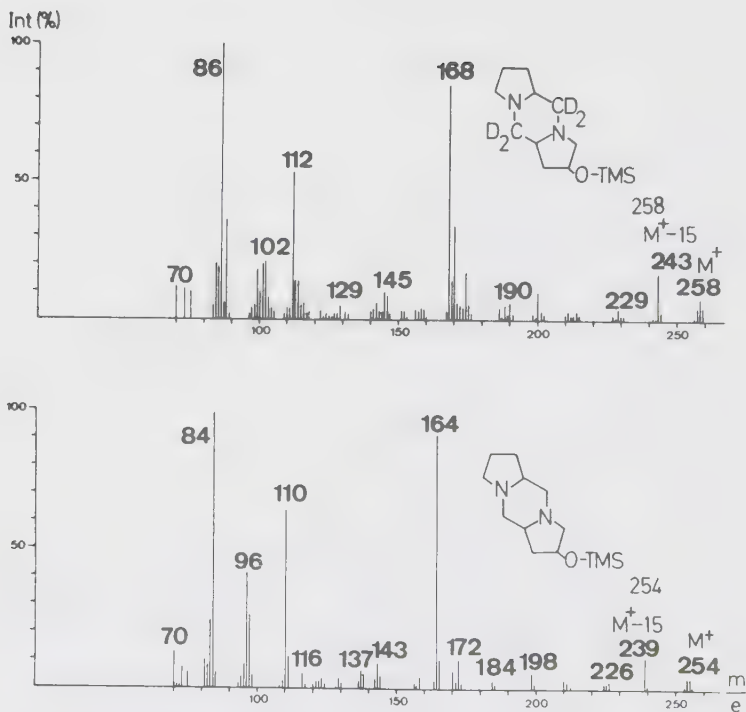


Fig. 12: Electron impact Massenspektrum bei 20 eV des durch die Derivatisierung als Nebenprodukt entstandenen deuterierten (oben) und hydrierten (unten) cyclo-Pro-Hyp-Derivats

Ein ähnliches Fragmentierungsverhalten im Massenspektrometer zeigte auch das Derivat von Glu-Hyp (XVI, XVII, Fig. 14).

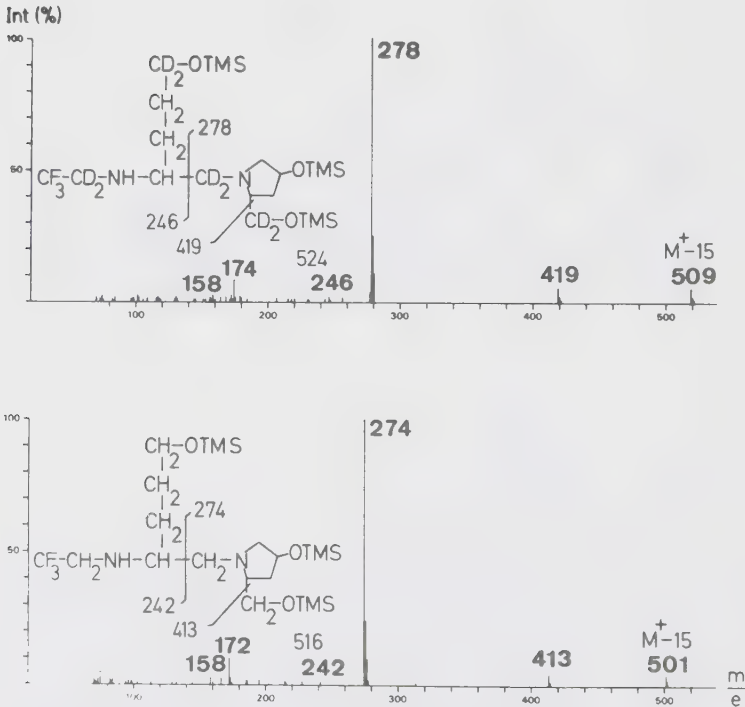


Fig. 14: Electron impact Massenspektrum bei 20 eV des im Urin gefundenen deuterierten (oben, XVI) und hydrierten (unten, XVII) Dipeptids Glu-Hyp (als N-Trifluoräthyl-O-trimethylsilyl-aminoalkohol)

Das reduzierte Gly-Pro (III, IV, Fig. 15) konnte in fast allen Urinen nachgewiesen werden. Dieses Peptid ist auch im Normalurin in relativ grosser Konzentration vorhanden (Abschn. 3.3.2).

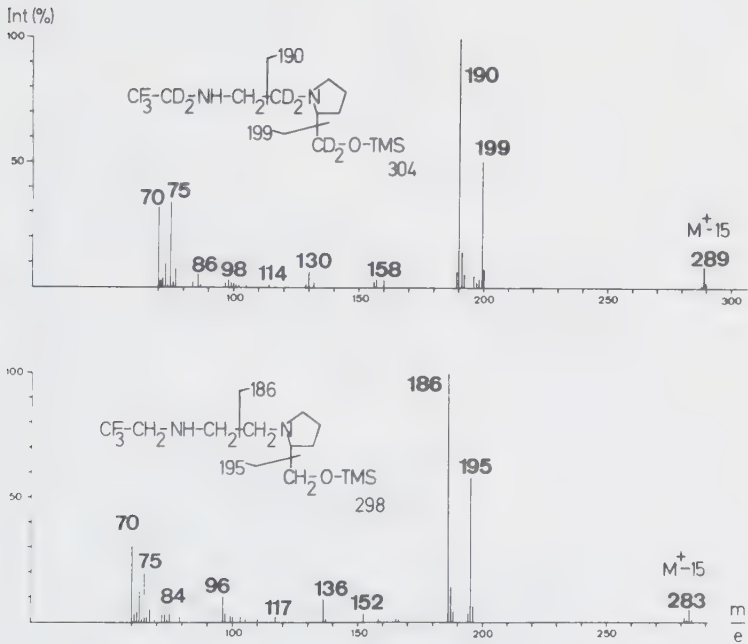


Fig. 15: Electron impact Massenspektrum bei 20 eV des im Urin gefundenen deuterierten (oben, III) und hydrierten (unten, IV) Dipeptids Gly-Pro (als N-Trifluoräthyl-O-trimethylsilyl-aminoalkohol)

Von den Derivaten der Tripeptide Gly-Pro-Hyp (XVIII, IXX, Fig. 16) und Gly-Hyp-Hyp (XX, XXI, Fig. 17) konnten gute Massenspektren erhalten werden, während von Gly-Hyp-Gly (XXII, XXIII) wegen des ungünstigen Signal zu Noise Verhältnisses kein Spektrum gezeichnet werden konnte.

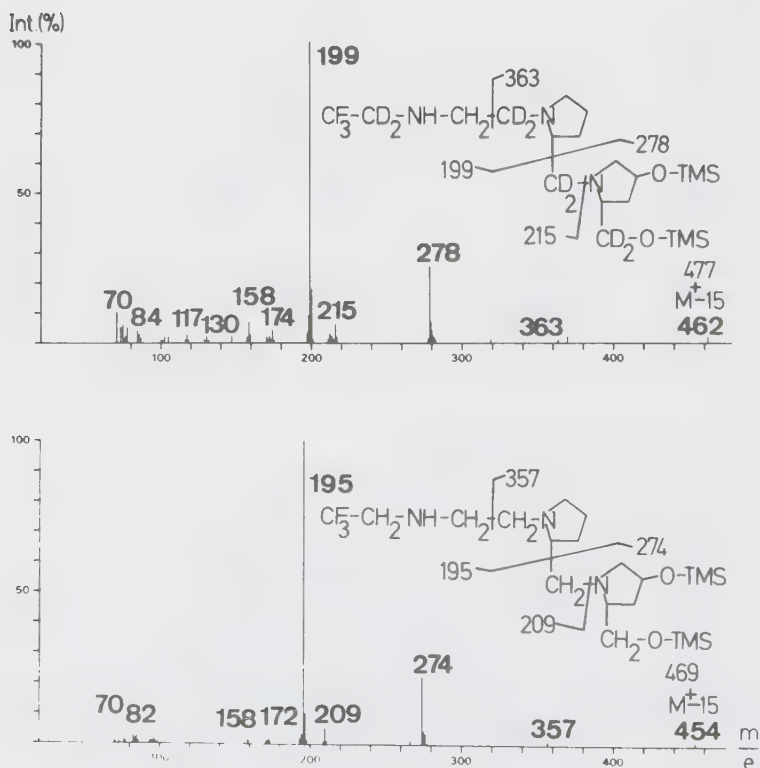


Fig. 16: Electron impact Massenspektrum bei 20 eV des im Urin gefundenen deuterierten (oben, XI) und hydrierten (unten, XII) Tripeptids Gly-Pro-Hyp (als N-Trifluoräthyl-O-trimethylsilyl-aminoalkohol)

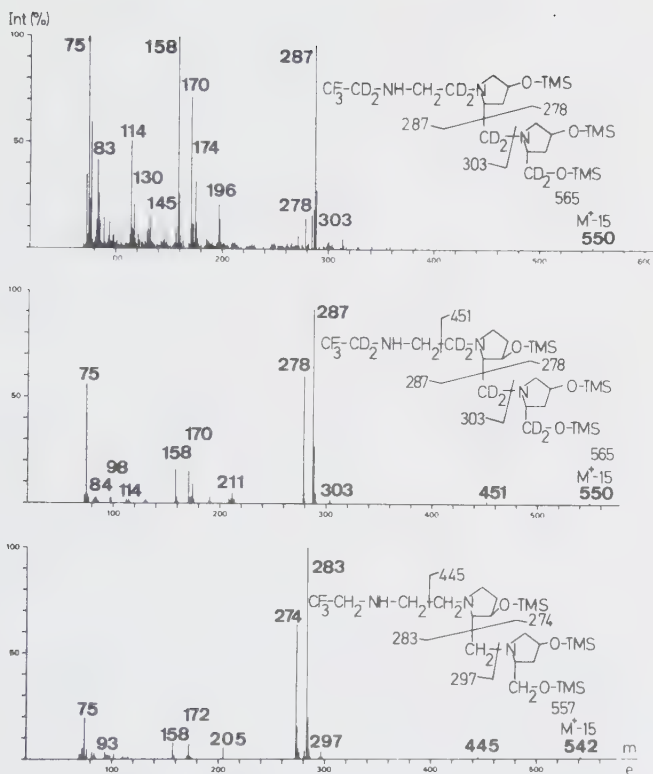


Fig. 17: Electron impact Massenspektrum bei 20 eV des im Urin gefundenen deuterierten (Mitte, XX) und hydrierten (unten, XXI) Tripeptids mit der postulierte Struktur Gly-3Hyp-4Hyp (als N-Trifluoräthyl-O-trimethylsilyl-aminoalkohol). Das oberste Bild gibt das Massenspektrum des deuterierten Aminoalkohols von synthetischem Gly-4Hyp-4Hyp wieder; es wurde aus einer GC-MS-Trennung über eine 1 m x 2 mm gepackte Kolonne mit 1% SE 30 auf Chromosorb AW DMCS erhalten.

Beim Gly-Hyp-Hyp handelt es sich sehr wahrscheinlich um die 3-Hydroxyprolin (3Hyp) enthaltende Verbindung Gly-3Hyp-4Hyp (siehe Fig. 17). Zu einem Vergleich stand uns nur die isomere Verbindung Gly-4Hyp-4Hyp zur Verfügung (Geschenk von Dr. E. Adams, Baltimore). Im Massenspektrum dieser mit LiAlD_4 reduzierten Verbindung fanden sich qualitativ dieselben Signale wie in der deuterierten Komponente aus dem Urin. Die relativen Intensitäten der Signale unterschieden sich aber deutlich (Fig. 17), wie dies oft bei Massenspektren isomerer Verbindungen beobachtet werden kann.

Wie Figur 18 zeigt, konnten bei genügender Substanzmenge mit CI Massenspektren erhalten werden, die neben dem Molekülion auch noch die Sequenzinformation lieferten. Bei kleiner Substanzmenge traten aber intensive Backgroundsignale störend hervor, so dass eine Interpretation mit Hilfe der Sequenzionen stark erschwert oder unmöglich wurde. Obwohl das unterste Bild in Figur 18 noch eine sichere Zuordnung erlaubt, deutet es doch an, wie ungünstig Fremdionen bei CI in Erscheinung treten können.

Mit Ausnahme von Gly-Pro-Hyp-Gly und Glu-Hyp konnten aber die bis jetzt erwähnten Peptide auch im Urin des gesunden N.I. nachgewiesen werden. Eine Uebersicht über die in den verschiedenen Urinen gefundenen Peptide gibt Tabelle 9. Das qualitative Ausscheidungsmuster ist offenbar nicht charakteristisch für die Krankheiten dieser untersuchten Patienten.

Neben der qualitativen Bestimmung von Urinpeptiden ist aber auch eine quantitative Bestimmung mit der Reduktionsmethode möglich.

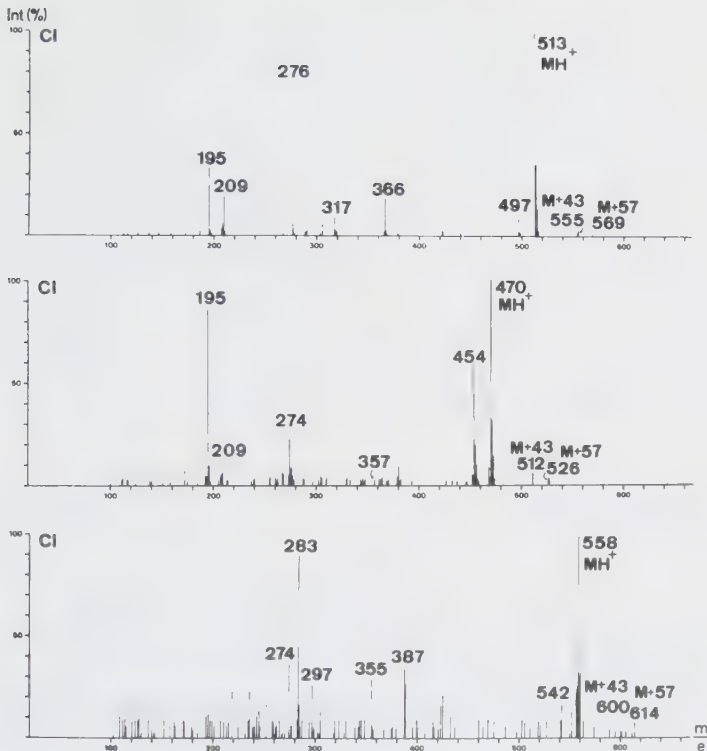


Fig. 18: Chemische Ionisationsspektren der hydrierten Derivate von Gly-Pro-4Hyp-Gly (oben, XIII), Gly-Pro-4Hyp (Mitte, XX) und Gly-3Hyp-4Hyp (unten, XXI) mit Isobutan als Reaktionsgas. Die Massenspektren wurden bei 50 eV und 100 μ A aufgezeichnet. Dieselbe Probe wurde analysiert wie in Fig. 10, 16 und 17, aber nachdem sie ein Jahr lang im Tiefkühler gelagert worden war.

Vier der gefundenen Peptide (Gly-Pro, Pro-Hyp, Gly-Pro-Hyp und Gly-Pro-Hyp-Gly) enthalten Prolin. Wenn diese Peptide mit deuteriertem Prolin synthetisiert werden, so können sie als interne Standards dem Urin zugesetzt und mit Massen-

fragmentographie die reduzierten Peptide gemessen werden. Damit wäre eine quantitative Bestimmung dieser Urinpeptide möglich. Weil das käufliche deuterierte Prolin sehr teuer ist, wurde 2,3,4,5-Tetradeutero-DL-prolin synthetisiert. Der Synthese lag die folgende Ueberlegung zugrunde: aus Pyrrol sollte leicht zugängliches 1,2-Dicarbethoxypyrrol anstelle von Wasserstoff (57) mit Deuterium katalytisch reduziert und 2,3,4,5-Tetradeutero-DL-prolin durch Abspaltung der 1-Carbethoxygruppe erhalten werden. Ein vierfach markiertes Prolin wäre bei Verwendung von Trimethylsilylderivaten für die Massenfragmentographie besonders günstig.

1,2-Dicarbethoxypyrrol

Die Synthese wurde leicht modifiziert nach (57) durchgeführt.

Magnesium (7.2 g $\pm$ 0.3 Mol) und 150 ml Diäthyläther wurden mit 3 kleinen Jodkristallen vorgelegt, 18.7 ml Methyljodid (0.3 Mol) innert 1 1/2 h zugetropft (Rückflusskühler) und danach noch 30 min zum Sieden erhitzt. Das Gemisch wurde auf -5° C gekühlt und in 35 min wurde bei 0° C 17 g Pyrrol (0.25 Mol) in 35 ml Diäthyläther zugetropft. Dazu wurde parallel ein weiterer Grignardansatz durchgeführt: 7.2 g Magnesium wurde in 74 ml Aether vorgelegt und 18.7 g Methyljodid in 75 ml Aether zugetropft. Nach Ende der Reaktion wurde das Reagens in einen 250 ml Tropftrichter gegeben und mit Aether auf 200 ml verdünnt. In einem 100 ml Tropftrichter wurde eine Lösung von 24.6 ml Chlorameisensäureäthylester 0.35 Mol gegeben und mit Aether auf 100 ml aufgefüllt. Die eine Hälfte davon wurde bei 0° C in den Reaktionskolben mit dem Pyrrol zugetropft, anschliessend die Hälfte (100 ml) des zweiten Grignard Reagens. Alternierend wurde so immer je die Hälfte des Chlorameisensäureäthylesters und des Grignard Reagens zugetropft, bis von beiden noch ca. 5-10 ml

Tab. 9: Zusammenstellung der in verschiedenen Urinen nachgewiesenen Peptide. E: Glu, F: Phe,
G: Gly, O: Hyp, P: Pro

Name	Diagnose	Geschl.	Alter	GP	PO	EO	FO	GOG	GPO	GOO	GPOG
M.A.	Gesund	w	37	-	-	-	-	-	-	-	-
N.I.	Gesund	m	7	+	+	-	+	+	+	+	-
M.F.*	Epilepsie, vermuteter Peptidasemangel	m	1	+	+	+	+	+	+	+	+
M.L.*	Vermuteter Peptidase- mangel	m	10	+	+	+	+	+	+	+	+
R.G.	Epilepsie unklarer Genese	m	3	-	+	+	-	-	+	+	-
B.E.	Idiopathische gingivale Fibromatose	m	20	-	+	+	+	-	+	+	-
T.F.	Mannosidose	w	4	+	+	+	+	+	+	+	-
Ma.L.	Cardiomyopathie	m	10	-	+	-	+	+	+	-	-
W.M.	Rachitis und Fanconi Syndrom	w	16	+	+	-	-	-	-	-	-

* Brüder

übrig blieben. Diese wurden zusammen in den Kolben gegeben und noch einmal 32.5 ml Chlorameisensäurediäthylester rasch zugetropft. Nachdem sich der Kolbeninhalt auf Raumtemperatur erwärmt hatte, wurde aufgeheizt und 4 Stunden am Rückfluss gekocht. Das Reaktionsgemisch wurde auf 200 g Eis ausgegossen und mit ca. 20-30 ml 2 N Schwefelsäure auf pH 2-3 gestellt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 200 ml Äther und die vereinigten Ätherphasen mit 30 ml 1 M Natriumcarbonatlösung extrahiert. Die organische Phase wurde über Nacht getrocknet, filtriert, zur Trockne eingedunstet und ergab 80 ml braunes Öl. Destillation bei 13 Torr ergab:

7.4 g 1-Carboethoxypyrrol (Sdp. $76-78^{\circ}\text{C}$) und 26.5 g 1,2-Dicarboethoxypyrrol und 2-Carboethoxypyrrol (Sdp. $120-142^{\circ}\text{C}$)

Die Fraktion von $120-142^{\circ}\text{C}$ wurde noch einmal unter einem Druck von 0.5 mm Hg destilliert. Ausbeuten:

6.9 g 2-Carboethoxypyrrol (Sdp. $52-55^{\circ}\text{C}$), 13.7 g 1,2-Dicarboethoxypyrrol ($\approx 26.5\%$, Sdp. $62-68^{\circ}\text{C}$)

Daten: R_t (1-Carboethoxypyrrol, 1 m 2% SE 30 Säule, 4 min isotherm bei 100°C , $100-250^{\circ}\text{C}$, 10°C/min) = 1.6 min, R_t (2-Carboethoxypyrrol) = 3.9 min, R_t (1,2-Dicarboethoxypyrrol) = 9 min, Massenspektren, m/e (% rel. Int.) M^+ , 6 intensivste Ionen:

1-Carboethoxypyrrol: 139, 67(100), $139(M^+)$, 43, 80(42), 41(36), 39(33), 66(20)

2-Carboethoxypyrrol: 139, 94(100), 93(92), $139(M^+)$, 40, 39(40), 66(36), 95(20)

1,2-Dicarboethoxypyrrol: 211 (M^+ , 8), 6 intensivste Ionen: 94(100), 93(89), 111(47), 66(31), 95(28), 67(22)

$^1\text{H-NMR}$ (1,2-Dicarboethoxypyrrol, t = Triplett, q = Quadruplett, m = Multipllett): 0.45/t ($-\text{CH}_2-$), 0.60/t ($-\text{CH}_2-$), 4.21/q ($-\text{CH}_2-$), 4.41/q ($-\text{CH}_2-$), 6.30/t (1H), 6.88/m (1H), 7.48/m (1H)

1,2-Dicarbethoxypyrrolidin-d₄

Deuteroäthanol/Deuteriumoxid, destilliert (20 ml) wurde mit 150 mg Platin(IV)oxid vorgelegt und dieses mit D₂ (6 atü) deuteriert: nach 2 h hatte der Katalysator ein schwammartiges Aussehen. Unter Luftabschluss wurde 4 g 1,2-Dicarbethoxypyrrol (0.019 Mol) zugegeben und 47 h bei 50° C (6 atü) deuteriert. Die Analyse mit GC-MS ergab einen Umsatz von 97%. Massenspektrum, m/e (% rel. Int.): 219 (M⁺, 1), 6 intensivste Ionen: 74(100), 39(89), 146(88), 38(26), 73(26), 101(24)
Der Deuterierungsgrad war: 17.5% d₃, 74% d₄, 7% d₅, 1.5% d₆

2,3,4,5-Tetradeutero-DL-prolin

1,2-Dicarbethoxypyrrolidin-d₄ (ca. 3.5 g $\hat{=}$ 0.016 Mol) wurde mit 92 ml konzentrierter Salzsäure versetzt und 12 h am Rückfluss gekocht. Nach Zugabe von 20 ml konzentrierter Salzsäure wurde weitere 24 h am Rückfluss gekocht. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt, in 100 ml destilliertem Wasser aufgenommen und auf eine Dowex 50W X8 Säule (60 x 5 cm) aufgetragen. Das Deuteroprolin wurde mit 1 M Pyridiniumacetat pH 5 eluiert. Nach 260 ml konnte Deuteroprolin im Eluat nachgewiesen werden (HEP, pH 1.9, 17 min, 4'000 V, Ninhydrinfärbung siehe Abschn. 2.2.1), nach weiteren 220 ml war es vollständig eluiert. Das Eluat wurde zur Trockne eingedampft.

Ausbeute: 1.2 g. Dieser Rückstand wurde in 20 ml Äthanol heiss gelöst, über Nacht bei -20° C gehalten und die entstandenen Kristalle filtriert und getrocknet.

Ausbeute: 1 g $\hat{=}$ 52.6%

Zur Analyse mit MS wurde das Trimethylsilylderivat verwendet.

Massenspektrum, m/e (% rel. Int.) M⁺, 6 intensivste Ionen:

263(<1), 146(100), 73(74), 147(40), 55(22), 74(16), 148(11)

Der Deuterierungsgrad war: 4% d₂, 17% d₃, 70% d₄, 9% d₅

Gly-Pro, Pro-Hyp und Gly-Pro-Hyp sind häufig im Urin zu finden (Tab. 9), ihre quantitative Bestimmung wäre zur Erfassung von Kollagenstoffwechselstörungen bestimmt interessant.

3.3 Diskussion

3.3.1 Reduktionsmethode

Die bisherigen Methoden zur Isolierung von Oligopeptiden aus Urin beruhen auf den Elektrolyteigenschaften von Peptiden oder auf der Fähigkeit dieser Verbindungen, Kupferkomplexe zu bilden. Seltener wird eine Trennung nach Molekulargewicht durchgeführt. Die zur Trennung verwendeten Verfahren bestehen zur Hauptsache aus Ionenaustauschchromatographie, Elektrophorese und Gelfiltration. Keines dieser Verfahren genügte aber allein für die Trennung der Peptide von den in 10-1'000-fachem Ueberschuss vorhandenen Aminosäuren und für die Trennung in die einzelnen Komponenten. Deshalb wurden meistens Kombinationen dieser drei Verfahren benützt. Ansorge und Hanson (58) benützten Elektrophorese zur Isolierung von Peptiden aus grossen Mengen Urin und reinigten die gewonnenen Fraktionen mit Sephadex G-25, mit den Ionenaustauschern KPS 200 X2 (sauer) und Dowex 1 (basisch) und mit Papierchromatographie. Bei der Kombination von sauren und basischen Ionenaustauschern wird die Eigenschaft benützt, dass Peptide und Aminosäuren amphotere Elektrolyte sind. Diese Kombination wurde häufig verwendet: Dowex 50, Dowex 2 (59), Zeo-Karb 225, Dowex 2 (3), Dowex 50, Dowex 1 (60). Eine andere oft benützte Kombination war Ionenaustauschchromatographie und

Gelfiltration (3,58,61,62). Die Gelfiltration allein (Trennung nach Molekulargewicht) erlaubt nur eine grobe Trennung von Oligopeptiden und Aminosäuren.

Die Ausnützung der Kupferkomplexbildung von Aminosäuren und Peptiden bot neue Möglichkeiten zur Trennung dieser zwei Substanzklassen. Aminosäuren bilden mit Kupferionen positiv geladene 1:1 oder neutrale 2:1 Komplexe, Peptide negativ geladene 1:1 Komplexe. Die Ionenaustauschchromatographie dieser Komplexe über TEAE-Zellulose (63) ermöglichte eine Trennung von neutralen Aminosäuren und neutralen Oligopeptiden (64), die Chromatographie über DEAE-Sephadex A-25 und DEAE-Sephadex A-50 eine Trennung in neutrale Aminosäuren, Dipeptide, Tri- und Oligopeptide (6). In einem anderen Verfahren wurde Sephadex G-25 (65) oder Chelex 100 (5,15,66) mit Kupferionen beladen und eine Trennung der beiden Substanzklassen mit Ligandaustauschchromatographie durchgeführt. Bei keinem der beschriebenen Verfahren war die Trennung von Aminosäuren und Peptiden aber vollständig und weitere Trennungsschritte waren nötig, um reine Peptide zu erhalten.

Die Massenspektrometrie ermöglicht die Identifizierung von Peptiden auch in Gemischen. Die Isolierungsverfahren von Peptiden aus Urin konnten deshalb vereinfacht werden. Trotzdem wurden bisher noch mehrere Reinigungsschritte benötigt: Faull und Mitarbeiter (18) reinigten Urinproben über Dowex 50W, fraktionierten über Sephadex G-10 und führten eine weitere Reinigung mit Papierchromatographie durch, während Johnstone und Mitarbeiter (15) Aminosäuren und Peptide über Chelex 100 trennten und eine Fraktionierung mit Gelchromato-

graphie durchführten.

Mit dem Reduktionsverfahren ist der Aufwand zur Isolierung geringer: nach einer Entsalzung der Urinprobe über Dowex 50W X8, wurden Oligopeptide als Aminoalkoholderivate über eine kleine Amberlite CG 50 II Säule relativ selektiv isoliert und nach Trimethylsilylierung direkt zur Analyse mit GC-MS verwendet. In drei Tagen ist die Analyse einer Urinprobe durchführbar, mit Diboran als Reduktionsmittel ist sie in zwei Tagen möglich. Natürlich spielen dabei die Erfahrung in der Interpretation von Massenspektren und die Ausrüstung mit Datenverarbeitungsanlagen eine wichtige Rolle.

Neben diesem einfacheren Isolierungsverfahren scheint ein anderer Punkt noch wesentlich; während die beiden erwähnten Arbeitsgruppen mit Massenspektrometrie nur Dipeptide in den rohen Peptidextrakten bestimmen konnten, gelang mit dem Reduktionsverfahren neben Dipeptiden noch der Nachweis von drei Tripeptiden und einem Tetrapeptid. Die Wasserstoff/Deuterium Markierung und die gute gaschromatographische Trennung der Aminoalkoholderivate auf einer Glaskapillare erlaubten eine relativ sichere Interpretation. Als sehr wertvoll erwies sich auch die CI, weil die Kenntnis des Moleküllions (MH^+) die möglichen Strukturen vor allem bei Tri- und Tetrapeptiden einschränkt.

Ein schwerwiegender Nachteil ist aber, dass die Ausbeuten an Aminoalkoholderivaten von Peptid zu Peptid variieren und dass sie für einfache Verbindungen wie Tetraglycin und Pentaglycin sogar Null sein können. Auch die Isolierung von Peptiden als Aminoalkoholderivate ist nicht vollständig selektiv, weil ein Teil der reduzierten Aminosäuren His, Lys, Phe und Tyr in der

Peptidfraktion enthalten sind. Dank der guten Trennleistung der Glaskapillare erwies sich dies jedoch nur beim Histidin als störend. Das Derivat von Histidin erschien im Gaschromatogramm ausnahmslos als breite Bande.

Urin enthält Spuren der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin. Mit dem Reduktionsverfahren konnten diese Verbindungen bisher nicht nachgewiesen werden, obwohl ihr chemisches Verhalten den Aminoalkoholderivaten ähnlich ist. Vermutlich bleiben sie bei der Vorreinigung der Urinproben am Kationenaustauscher hängen und werden mit Ammoniak nicht eluiert.

Abgesehen von der Schwierigkeit, dass sich gewisse Peptide nur in sehr schlechter Ausbeute derivatisieren lassen, eignet sich die Methode gut zur Analyse von Kollagenpeptiden und Hyperoligopeptidurie. Zur Bestimmung von Peptidhormonen im Urin ist sie zu wenig empfindlich.

3.3.2 Urinoligopeptide

Pro-Hyp ist normalerweise das dominante Hyp-Peptid im Urin (67). Es macht etwa die Hälfte des Totalhydroxyprolins im Urin aus und wurde in vielen weiteren Untersuchungen beschrieben (3,18,60,68,69,70,71). Pro-Hyp ist auch in den mit dem Reduktionsverfahren untersuchten Urinen die Hauptkomponente (Ausnahmen: M.F. und M.L.). Ein weiteres häufig erwähntes Dipeptid ist Gly-Pro (60,69,72,73,74). Bei Prolidasemangel wird es in sehr grossen Mengen ausgeschieden (3,15,18,75,76). Ebenso konnte Glu-Hyp von mehreren Arbeitsgruppen im Urin nachgewiesen werden (3,18,60,61,62,

75) und auch Phe-Hyp wurde in einer neuen Arbeit erwähnt (59).

Das Tripeptid Gly-Pro-Hyp wurde zum ersten Mal von Meilman und Mitarbeitern (67) identifiziert und seither noch von weiteren Autoren als Urinpeptid charakterisiert (70,71). Gly-Hyp-Hyp, ein weiteres der drei mit dem Reduktionsverfahren gefundenen Tripeptide, wurde im Urin einer Patientin mit Osteomalazie und Hyperparathyroidismus (3) gefunden, die Sequenz konnte aber mangels Material nicht endgültig bewiesen werden. In einer neu erschienenen Arbeit (62) wurde aber ein Urinpeptid mit der Sequenz Gly-3Hyp-4Hyp charakterisiert. Die Sequenz mit zwei aufeinanderfolgenden Hydroxyprolinen kommt im Kollagen des Menschen ausschliesslich als -3Hyp-4Hyp- vor (77). Die gefundene Urinkomponente ist daher mit ziemlicher Sicherheit Gly-3Hyp-4Hyp. Einen Hinweis dazu geben auch die unterschiedlichen Intensitäten der Ionen 287 und 278 in den Massenspektren der Aminoalkoholderivate von synthetischem Gly-4Hyp-4Hyp und dem Tripeptid aus Urin (Fig. 17). Endgültig beweisen liesse sich die Struktur aber erst, wenn synthetisches Gly-3Hyp-4Hyp zugänglich würde.

Gly-Pro-Hyp-Gly (nur bei einer Familie nachgewiesen) und Gly-Hyp-Gly sind zwei Peptide, die nach Reduktion als Urinpeptide identifiziert wurden und die in der Literatur nicht beschrieben wurden. Andererseits konnten bei unseren Patienten folgende Peptide nicht nachgewiesen werden, die bei Patienten mit Prolidasemangel ausgeschieden wurden: Ala-Hyp (18,75), Gly-Hyp, Ser-Hyp (75) und Leu-Hyp (18), sowie Di-peptide mit C-terminalem Prolin: Ala-Pro, Asx-Pro, Leu-Pro, Val-Pro (18,75,76), Lys-Pro (18), Phe-Pro, Ser-Pro und

Thr-Pro (75,76). Bei einer Patientin mit Hyperparathyroidismus und Osteomalazie (3) wurden ebenfalls Ala-Hyp, Gly-Hyp, Leu-Hyp und Ser-Hyp als Urinpeptide charakterisiert und Szymanowicz und Mitarbeiter (62) beschrieben bei einem Patienten mit Morbus Paget weitere bei unseren Patienten nicht gefundene Urinpeptide: Hyp-Gly, 3Hyp-Hyp-Gly, Hyp-Gly-3Hyp, Ser-Hyp-Gly, Hyp-Gly-Ser-Hyp-Gly und Ala-Hyp-Gly-Ala-Hyp.

Es wurden aber noch andere, nicht vom Kollagen abgeleitete Urinpeptide beschrieben, die mit dem Reduktionsverfahren nicht gefunden wurden: β -Aspartyl-, γ -Glutamylpeptide (Tab. 10) und Carnosin (β -Ala-His).

Die β -Aspartylpeptide werden nun beim Menschen in Mengen von 150-250 μ Mol pro 24 h Urin (1-1.5 g Kreatinin) ausgeschieden und für β -Asp-Gly wurde die Konzentration bei Kindern zu ca. 80 μ Mol/g Kreatinin bestimmt (78). Dies sind Mengen, die mit der Reduktionsmethode ohne weiteres erfasst werden sollten.

Dorer und Mitarbeiter (83) wiesen aber darauf hin, dass bei der Isolierung von β -Aspartylpeptiden die zum Entsalzen des Urins über Dowex 50W X8 verwendete Menge Wasser sehr kritisch ist und bei einem Ueberschuss die Peptide eluiert werden. Aus diesem Grunde wurde nur so lange mit Wasser gespült, bis das Eluat neutral war (81). Zur Abtrennung von Neutralstoffen und Säuren wurde bei unserem Verfahren 1 Liter Wasser verwendet, eine Menge, die vermutlich genügte, die β -Aspartyl- und γ -Glutamylpeptide von der Säule zu eluieren.

Tab. 10: Urinoligopeptide ohne Hydroxyprolin

<u>α-Aspartylpeptide</u>	<u>Lit.</u>
α -Asp-Gly	59

<u>β-Aspartylpeptide</u>	
β -Asp-Ala, β -Asp-Asp, β -Asp-Glu, β -Asp-Gly, β -Asp-Ser, β -Asp-Thr	59,78
β -Asp-Leu, β -Asp-Val	59
β -Asp-His	79,80
β -Asp-Lys	81
N ^ε -(β -Asp)-Lys	82
β -Asp-Gly-Ala, β -Asp-Gly-Asn, β -Asp-Gly-Glu, β -Asp-Gly-Gly, β -Asp-Gly-Pro, β -Asp-Gly-Val	59

<u>γ-Glutamylpeptide</u>	
γ -Glu-Ile, γ -Glu-Leu, γ -Glu-Val	59
γ -Glu-Orn	81
γ -Glu-Gly, γ -Glu-Thr	78

3.3.3 Urinhydroxyprolin und Kollagenabbau

Vom Kollagenabbau ist folgendes bekannt: Eine spezifische Kollagenase spaltet das Kollagen in zwei Teile, an einem Punkt, der in ungefähr dreiviertel Länge des Moleküls vom Aminoterminal entfernt liegt (84). Die entstandenen Fragmente denaturieren und werden durch Gelatinasen (84) oder nach Pinocytose im phagolysosomalen System durch Kathepsin B1 abgebaut (85). Weil das freie Hydroxyprolin und das Hydroxyprolin in Peptiden nicht für die Synthese von Kollagen verwendet wird, müssen diese Abbauprodukte entweder ausgeschieden oder zu anderen Produkten katabolisiert werden.

In den Nieren wird das freie Hydroxyprolin in der gleichen Weise transportiert wie andere Aminosäuren, d.h. es wird in den Tubuli beinahe vollständig resorbiert und hat niedrige Clearance-Werte (86). Das zurückgewonnene Hydroxyprolin wird metabolisiert (87). Hingegen zeigen Hyp-Peptide nur eine partielle tubuläre Resorption, sie werden vorwiegend ausgeschieden und können oft nicht weiter abgebaut werden (86). Typische Beispiele dafür sind Pro-Hyp und Gly-Pro-Hyp, deren Sequenzen im Kollagen häufig auftreten (88,89). Die Sequenz der gefundenen Tripeptide Gly-Hyp-Gly und Gly-3Hyp-4Hyp ist im Kollagentyp I nur ein einziges Mal anzutreffen, letztere im Kollagentyp IV etwas häufiger (77). Es ist bemerkenswert, dass diese selten auftretenden Sequenzen doch in beachtlicher Konzentration zu finden sind (vgl. dazu Fig. 9); die Chromatogramme der meisten anderen Urine boten ein ähnliches Bild.

Adams (90) diskutiert für das Vorkommen 3Hyp-haltiger Peptide im Urin zwei Möglichkeiten. Die eine ist, dass Basalmembranen (Kollagen Typ IV) einen wesentlich grösseren Umsatz zeigen als das interstitielle Kollagen (Typ I), die andere, dass Peptide mit 3Hyp eine grössere Resistenz gegen proteolytische Spaltungen aufweisen als solche, die nur 4Hyp enthalten. Weil das Verhältnis von 3Hyp und 4Hyp auch während des Wachstums, in welchem der Knochenstoffwechsel die hauptsächliche Quelle für den erhöhten Hydroxyprolin-Spiegel ist, konstant bleibt, kommt wahrscheinlich vor allem das interstitielle Kollagen als Ursprung für das 3Hyp im Urin in Betracht. Mit dieser Vermutung wäre zur Hauptsache eine grosse Resistenz gegen Proteasen für das Vorkommen des Gly-3Hyp-4Hyp im Urin verantwortlich.

Im Gegensatz dazu kommt die Sequenz Gly-Pro-Hyp-Gly im Kollagen sehr häufig vor (88); das Peptid erscheint normalerweise aber nicht im Urin. Bei den Brüdern M.F. und M.L. konnte dieses Tetrapeptid in hoher Konzentration nachgewiesen werden (Fig. 9), obwohl das Totalhydroxyprolin normal war. Der Grund für das Auftreten dieses ungewöhnlichen Kollagen-abbauprodukts im Urin der Geschwister dürfte ein Peptidase-defekt sein.

3.3.4 Bedeutung der Hyp-Oligopeptide

Bisher wurde von der Voraussetzung ausgegangen, die gefundenen Urinpeptide stammten vom Kollagen. Es sind aber noch weitere hydroxyprolinhaltige Proteine bekannt: das Elastin und die Komponente Clq des Komplementsystems (91,92).

Das Kollagen macht etwa ein Viertel des Gesamtkörper-Proteins aus und etwa die Hälfte davon ist im Knochen enthalten (86). Es enthält etwa 13% Hydroxyprolin, Elastin aber nur 1-2% (93). Aus diesem und anderen Gründen ist der Beitrag an Hyp-Peptiden aus Elastin vernachlässigbar (86). Der Einfluss der Komponente Clq wurde während der Wundheilung an Ratten näher untersucht (94). Auch bei dieser Arbeit wurde das im Urin ausgeschiedene Hydroxyprolin dem Kollagenabbau zugeordnet, während das proteingebundene Hydroxyprolin im Serum dem Komplementmetabolismus zugeschrieben wurde.

Wenn das Hydroxyprolin im Urin aus dem Kollagen stammt, ist es wichtig zu wissen, welchem Anteil des ursprünglichen Kollagens es entspricht. Untersuchungen an Patienten mit Hydroxyprolinoxydasemangel (95,96) und an Ratten mit radioaktiv markierten Peptiden (97) ergaben, dass nur etwa 10% des Hydroxyprolins im Urin ausgeschieden werden und dass der Rest metabolisiert wird (86). Von diesen 10% werden etwa 97% in peptidgebundener Form und ungefähr 3% als freies Hydroxyprolin ausgeschieden (93). Der peptidgebundene Anteil setzt sich aus etwa 20% Polypeptiden und 80% Oligopeptiden zusammen (86).

Verschiedene Autoren (67,86,93,98) behaupten, dass sich die Hyp-haltigen Oligopeptide im Urin bei Gesunden und bei Patienten mit verschiedenen Krankheiten qualitativ nicht unterscheiden. Wir untersuchten die Urine von 7 Patienten, konnten aber bei dieser kleinen Zahl schon ein ungewöhnliches Urinpeptid, Gly-Pro-Hyp-Gly, nachweisen. Anhand einer grösseren Zahl Patienten müsste allerdings untersucht werden, ob unsere Beobachtung ein Zufall war oder ob das Peptidaus-

scheidungsmuster bei Krankheiten normalerweise keine qualitativen Unterschiede ergibt.

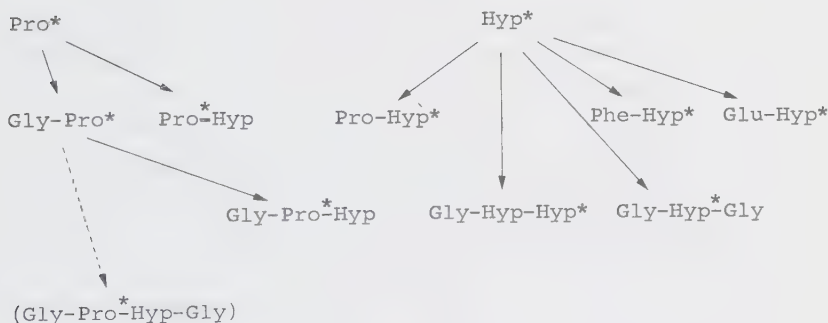
Quantitativ ist die Ausscheidung zum Teil jedoch deutlich verschieden, vor allem ist sie erhöht bei Knochenkrankheiten wie Morbus Paget (98), Knochentumoren, Osteomalazie und verschiedenen Rachitisformen, Hyperparathyreoidismus und Hyperthyreose, Fanconi Syndrom, Marfan's Syndrom, einigen Kollagenkrankheiten etc. (86 und darin zitierte Literaturstellen).

In erster Linie ist eine qualitative Bestimmung von Urinpeptiden interessant. Medizinisch könnte aber neben einer qualitativen auch eine quantitative Analyse diagnostische Bedeutung erlangen. So würde die Menge und Art der Hyp-haltigen Oligopeptide präzisere Aussagen über Kollagenstoffwechselstörungen zulassen als der Totalhydroxyprolingehalt des Urins.

3.3.5 Quantitative Bestimmung von Kollagenpeptiden

Die in der Literatur beschriebenen quantitativen Messungen von Peptiden wurden mit gereinigten Verbindungen durchgeführt. Das gereinigte Peptid wurde anhand seines Hydroxyprolingehalts nach Hydrolyse (62,67,71), bei Verwendung radioaktiver Verbindungen nach der gefundenen Radioaktivität (97) oder mit Hilfe eines zum Urin zugesetzten radioaktiven Standards (70,99) quantifiziert. Auch bei der quantitativen Bestimmung von Gly-Pro-Hyp-Gly (Abschn. 3.2.3) wurde das Tetrapeptid gereinigt und seine Menge durch Messung der Extinktion des Dinitrophenylderivats bestimmt.

Mit der Reduktionsmethode bietet sich eine Möglichkeit, Kollagenpeptide in Gemischen quantitativ zu bestimmen. Alle gefundenen Peptide enthalten Prolin oder Hydroxyprolin. Wenn diese Peptide mit deuteriertem Prolin oder Hydroxyprolin synthetisiert werden, so können sie als interne Standards zugesetzt und mit Hilfe von Massenfragmentographie die Peptide als Aminoalkoholderivate gemessen werden. Die Synthesen wären relativ einfach, weil einfache Aminosäuren benötigt werden, die Synthesen der meisten Peptide bekannt sind und der einmalige Einsatz einer deuterierten Aminosäure genügen würde.



So würde z.B. 2,3,4,5-Tetradeutero-DL-prolin (Abschn. 3.2.3) die Synthese von markiertem Gly-Pro, Pro-Hyp und Gly-Pro-Hyp ermöglichen, die im Urin häufig auftreten. Störungen im Kollagenmetabolismus sollten sich anhand dieser drei Verbindungen quantitativ erfassen lassen.

LITERATUR

- (1) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Pure and Applied Chemistry 31, 641 (1972)
- (2) B.KOLB (1971) in New Techniques in Amino Acid, Peptide and Protein Analysis (A.NIEDERWIESER and G.PATAKI eds.) ppl29-174 Ann. Arbor Science Publ., Ann. Arbor, Michigan
- (3) R.CAHILL, R.SMITH and R.G.WESTALL, Clin. Sci. 38, 519 (1970)
- (4) P.B.HAMILTON and M.F.LOU, Biochem. Med. 6, 193 (1972)
- (5) N.R.BUIST, D.O'BRIEN, J.Chromatogr. 29, 398 (1967)
- (6) P.GILIBERTI and A.NIEDERWIESER, J.Chromatogr. 66, 261 (1972)
- (7) H.NAU, Biochem. Biophys. Res. Comm. 59, 1088 (1974)
- (8) J.A.KELLEY, H.NAU, H.-J.FOERSTER and K.BIEMANN, Biomed. Mass Spectrom. 2, 313 (1975)
- (9) H.NAU, H.-J.FOERSTER, J.A.KELLEY and K.BIEMANN, Biomed. Mass Spectrom. 2, 326 (1975)
- (10) W.BLUM and W.J.RICHTER, J.Chromatogr. 132, 249 (1977)
- (11) H.C.KRUTZSCH and J.J.PISANO, Biochemistry 17, 2791 (1978)
- (12) M.A.YOUNG and D.M.DESIDERIO, Anal. Biochem. 70, 110 (1976)
- (13) R.M.CAPRIOLI, W.E.SEIFERT and D.E.SUTHERLAND, Biochem. Biophys. Res. Comm. 55, 67 (1973)
- (14) W.E.SEIFERT, R.E.MACKEE, C.F.BECKER and R.M.CAPRIOLI, Anal. Biochem. 88, 149 (1978)
- (15) R.A.JOHNSTONE, T.J.POVALL, J.-L.POUSSET, CH.CHARPENTIER and A. LEMONNIER, Clin. Chim. Acta 52, 137 (1974)
- (16) B.G.DAWKINS, P.J.ARPINO and F.W.MCLAFFERTY, Biomed. Mass Spectrom. 5, 1 (1978)
- (17) F.WEYGAND, A.PROX, H.H.FESSEL und K.K.SUN, Z.Naturforsch. 20b, 1169 (1965)
- (18) K.F.FAULL, G.M.SCHIER, P.SCHLESINGER and B.HALPERN, Clin. Chim. Acta 70, 313 (1976)
- (19) W.R.ANDERSON, W.FRICK, G.D.DAVES, D.F.BAROFSKY, D.CHANG, K.FOLKERS and S.ROSELL, Biochem. Biophys. Res. Comm. 78, 372 (1977)
- (20) I.LUEDERWALD, M.PRZYBYLSKI, H.RINGDORF und D.SILBERHORN, Z. Naturforsch. 33b, 805 (1978)

- (21) I.LUEDERWALD, M.PRZYBYLSKI, H.RINGDORF und D.SILBERHORN,
Z. Naturforsch. 33b, 809 (1978)
- (22) D.C.DEJONGH, G.FAUS, M.S.NAYAR, G.BOILEAU and L.BRAKIER-GINGRAS,
Biomed. Mass Spectrom. 3, 191 (1976)
- (23) R.A.JOHNSTONE, T.J.POVALL, J.-L.POUSSET, CH.CHARPENTIER and
A.LEMONNIER, Biochem. Biophys. Res. Comm. 63, 881 (1975)
- (24) E.VILKAS and E.LEDERER, Tetrahedron 26, 3098 (1968)
- (25) P.A.LECLERCQ and D.M.DESIDERIO, Anal. Lett. 4, 305 (1971)
- (26) A.MURAI and Y.TAKEUCHI, Bull. Chem. Soc. Japan 48, 2911 (1975)
- (27) H.R.MORRIS, A.DELL and T.E.PETERSON, L.SOLTRUP-JENSEN and
S.MAGNUSSON, Biochem. J. 153, 663 (1976)
- (28) M.MUDGETT, D.V.BOWEN, F.H.FIELD and T.J.KINDT, Biomed. Mass
Spectrom. 4, 159 (1977)
- (29) J.D.PRIDDLE, K.ROSE and R.E.OFFORD, Biochem. J. 157, 777 (1976)
- (30) F.MOHAMMADI-TABRIZI, J.Chromatogr. 150, 207 (1978)
- (31) H.NAU, Angew. Chem. 88, 74 (1976)
- (32) H.HOERMANN, A.GRASSMANN, E.WUENSCH und H.PRELLER, Chem. Ber.
89, 933 (1956)
- (33) R.T.APLIN, I.ELAND and J.H.JONES, Org. Mass Spectrom. 2, 795 (1969)
- (34) L.BERTILLSON and E.COSTA, J.Chromatogr. 118, 395 (1976)
- (35) H.NAU and K.BIEMANN, Anal. Biochem. 73, 139 (1976)
- (36) H.NAU and K.BIEMANN, Anal. Biochem. 73, 154 (1976)
- (37) G.M.HASS, H.NAU, K.BIEMANN, D.T.GRAHN, L.H.ERICSON and H.NEURATH,
Biochemistry 14, 1334 (1975)
- (38) R. und A.CLOTTEN (1962) Hochspannungselektrophorese, G. Thieme
Verlag
- (39) E.STAHL (1962) Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag
- (40) International Union of Pure and Applied Chemistry, Nomenclature
of Organic Chemistry, Sections A, B and C. Butterworths 1971
- (41) G.ZWEIFEL and H.C.BROWN, Organic Reactions 13, 1 (1963)
- (42) H.FRANK, H.J.CHAVES and E.BAYER, J.Chromatogr. 152, 357 (1978)
- (43) F.WEYGAND, R.GEIGER und U.GLOECKLER, Chem. Ber. 6, 1543 (1956)
- (44) J.-L.PIERRE, H.HANDEL et R.PERRAUD, Tetrahedron 31, 2795 (1975)
- (45) H.HANDEL et J.-L.PIERRE, Tetrahedron Lett. 24, 2029 (1976)

- (46) J.-L.PIERRE et H.HANDEL, *Tetrahedron Lett.* 26, 2317 (1974)
- (47) E.C.ASHBY and J.R.BOONE, *J.Amer. Chem. Soc.* 98, 5524 (1976)
- (48) H.C.BROWN and P.HEIM, *J.Org. Chem.* 38, 912 (1976)
- (49) C.F.LANE, *Chem. Rev.* 76, 773 (1976)
- (50) Z.B.PAPANASTASSIOU and R.J.BRUNI, *J.Org. Chem.* 29, 2870 (1964)
- (51) H.C.BROWN and P.M.WEISSMANN, *J.Amer. Chem. Soc.* 87, 5614 (1965)
- (52) H.FRANK and D.M.DESIDERIO, *Anal. Biochem.* 90, 413 (1978)
- (53) H.NAU and J.F.RJORDAN, *Biochemistry* 14, 5285 (1975)
- (54) M.BRENNER und W.HUBER, *Helv. Chim. Acta* 36, 1113 (1953)
- (55) F.WEYGAND und R.GEIGER, *Chem. Ber.* 89, 647 (1956)
- (56) G.S.POINDEXTER, and A.I.MEYERS, *Tetrahedron Lett.* 40, 3527 (1977)
- (57) F.G.SIGNAIGO and H.ADKINS, *J.Amer. Chem. Soc.* 58, 1122 (1936)
- (58) S.ANSORGE und H.HANSON, *Z. Physiol. Chem.* 348, 334 (1967)
- (59) D.L.BUCHANAN, E.E.HALEY and R.T.MARKIW, *Biochemistry* 7, 612 (1962)
- (60) M.J.GORTATOWSKY, K.N.SHAW and W.A.SCHROEDER, *Biochem. Med.* 5, 348 (1971)
- (61) F.W.WAGNER, B.R.KAPLEAU and S.L.SHEPHERD, *Biochem. Med.* 13, 343 (1975)
- (62) A.SZYMANOWICZ, A.MALGRAS, A.RANDOUX and J.P.BOREL, *Biochimica et Biophysica Acta* 576, 253 (1979)
- (63) D.K.TOMMEL, J.F.VLIEGENTHART, T.J.PENDERS and J.F.ARENS, *Biochem. J.* 107, 335 (1968)
- (64) A.NIEDERWIESER and H.-CH. CURTIUS, *J. Chromatogr.* 51, 491 (1970)
- (65) S.FAZAKERLEY and D.R.BEST, *Anal. Biochem.* 12, 290 (1965)
- (66) J.BOISSEAU et P.JUAN, *J. Chromatogr.* 54, 231 (1967)
- (67) E.MEILMAN, M.M.URIVETZKY and C.M.RAPAPORT, *J. Clin. Invest.* 42, 40 (1963)
- (68) R.G.WESTALL, *Biochem. J.* 60, 247 (1955)
- (69) J.W.SKAKINS, *Arch. Dis. Childh.* 38, 215 (1963)
- (70) A.C.KIBRICK and A.T.MILHORAT, *Biochem. Med.* 4, 79 (1970)
- (71) A.SZYMANOVICZ, A.MALGRAS, R.COSSON and J.-P.BOREL, *Ann. Biol. clin.* 33, 351 (1975)
- (72) C.R.SCRIVER, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 42, 357 (1964)
- (73) P.D.SAVILLE and M.H.ALDERMAN, *Arch. Intern. Med.* 125, 341 (1970)

- (74) S.I.GOODMAN, C.C.SALOMONS, F.MUSCHENHEIM, C.A.MCINTYRE, B.MILES and D.O'BRIEN, *Am. J. Med.* 45, 152 (1968)
- (75) N.M.BUIST, J.J.SHANDOLM, J.F.BELLINGER and N.F.KENNAWAY, *Metabolism* 21, 1113 (1972)
- (76) G.F.POWELL, M.A.RASCO and R.M.MANISCALO, *Metabolism* 23, 505 (1974)
- (77) R.M.GRYDER, M.LAMON and E.ADAMS, *J. Biol. Chem.* 250, 2470 (1975)
- (78) T.TANAKA and T.NAKAYAMA, *J. Biochem.* 84, 617 (1978)
- (79) Y.KAKIMOTO and M.D.ARMSTRONG, *J. Biol. Chem.* 236, 3280 (1961)
- (80) J.J.PISANO, J.FREEDMAN and L.COHEN, 22, 610 (1963)
- (81) M.F.LOU, *Biochemistry* 14, 3503 (1975)
- (82) J.P.KAMERLING, G.AARSEN, P.K.DE BREE, M.DURAN, S.K.WADMAN, J.V. Vliegenthart, G.I.TESSER and K.M.VAN DER WAARDE, *Clin. Chim. Acta* 82, 85 (1978)
- (83) F.E.DORER, E.E.HALEY and D.L.BUCHANAN, *Biochemistry* 5, 3236 (1966)
- (84) J.B.WEISS, *Int. Rev. Conn. Tiss. Res.* 7, 101 (1976)
- (85) M.C.BURLEIGH, A.J.BARRET and G.S.LAZARUS, *Biochemistry J.* 137, 287 (1974)
- (86) K.I.KIVIRIKKO, *Int. Rev. Conn. Tiss. Res.* 5, 93 (1970)
- (87) E.ADAMS, *Int. Rev. Connect. Tiss. Res.* 5, 1 (1970)
- (88) P.P.FIETZEK und K.KUHN, *Mol. Cellular Biochem.* 8, 141 (1975)
- (89) K.A.PIEZ (1976) in *Biochemistry of Collagen* (G. N.RAMACHANDRAN and A.H.REDDI eds.) pp 1-40, Plenum Press, New York and London
- (90) E.ADAMS, S.RAMASWAMY and M.LAMON, *J. Clin. Invest.* 61, 1482 (1978)
- (91) K.B.REID, *Biochem. J.* 141, 189 (1974)
- (92) K.B.REID and D.M.LOWE, *Biochem. J.* 143, 265 (1974)
- (93) M.ZIFF, A.KIBRICK, E.DRESNER and H.J.GRIBETZ, *J. Clin. Invest.* 35, 579 (1956)
- (94) M.NAGELSCHMIDT and H.STRUCK, *Res. exp. Med.* 170, 211 (1977)
- (95) M.L.EFRON, E.M.BIXBY, T.D.HOCKADAY, L.H.SMITH and E.MESHOFER, *Biochim. Biophys. Acta* 165, 238 (1968)
- (96) R.PELKONEN and K.KIVIRIKKO, *N. Engl. J. Med.* 283, 451 (1970)
- (97) P.H.WEISS and L.KLEIN, *J.Clin. Invest.* 48, 1 (1969)
- (98) G.B.THEIL and K.AJLOUNI, *J.Lab. Clin. Med.* 90, 803 (1977)
- (99) H.E.JASIN, C.W.FINK, W.WISE and M.ZIFF, *J.Clin. Invest.* 41, 1928 (1962)

DANK

An erster Stelle danke ich Herrn Dr. Niederwieser für die Betreuung und die vielen Anregungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Herrn Professor Humbel danke ich für sein Interesse und seine Bereitschaft, diese Dissertation in der Philosophischen Fakultät II zu vertreten. Herrn Wetzl, der bei allen Schwierigkeiten am Massenspektrometer hilfsbereit eingesprungen ist, sei speziell gedankt. Für Hilfe im Labor danke ich Frl. Matasovic, Herrn Hüppi und Herrn Albrecht und für wertvolle Diskussionen bei der Interpretation von Massenspektren den Herren Dr. Kuster und Redweik. Herrn Neuheiser danke ich für die Unterstützung an der Datenverarbeitungsanlage.

LEBENS LAUF

Name/Vorname: Steiner Walter Ernst
Geboren: 13. September 1944, in Zürich
Bürgerort: Zürich
1951 - 1959 Primar- und Sekundarschule, Zürich
1959 - 1963 Oberrealschule, Zürich
1963 - 1967 Lehre als Chemielaborant in der CIBA-GEIGY, Basel
1967 - 1970 Berufstätig, daneben Akademikergemeinschaft: Matura, Typus B
1970 Frühjahr Matura, 4 Monate Aufenthalt in England als Laborant (CIBA-GEIGY)
1970 - 1974 Studium an der ETHZ, Abt. X, Bd (Biochemie und Mikrobiologie). Diplom Herbst 1974
1974 - 1975 Studium (Klinische Chemie) an der Universität Zürich
1975 - 1979 Doktorand am Kinderspital in Zürich unter Leitung von PD Dr. A. Niederwieser

Vorlesungen, Uebungen und Kurse besuchte ich bei folgenden Dozenten:

ETHZ: Arigoni, Bättig, Berger, Busch, Camenzind, Dutler, Eppenberger, Eschenmoser, Ettlinger, Fringeli, Geier, Günthard, Hütter, Jeger, Keese, Kern, Kneuenbühl, Koller, Leisinger, Lezzi, Martius, Meier, Moor, Mühlethaler, Olsen, Pfister, Ruch, Rudinger, Ruest, Schneider, Schwyzer, Seibl, Semenza, Simon, Stambach, Ulrich, Ursprung, Wild, Würgler, Wüthrich, Zuber

UNI: Bauknecht, Bühlmann, Christen, Curtius, Froesch, Gmür, Hedinger, Humbel, Kägi, Keller, Krebsner, Niederwieser, Rosenmund, Rutishauser, Rüttner, Schmid, Straub, Töndury, Weissmann

